



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

공학석사 학위논문

수산화기 생성량 계측을 통한  
플라즈마와 방사선의 세포 위해  
동등성 연구

**Study on the Cytotoxic Equivalency of  
Plasma and Radiation by Quantitating  
OH Radical Production**

2013년 8월

서울대학교 대학원  
에너지시스템공학부  
이진한

수산물 생산량 계측을 통한  
플라즈마와 방사선의 세포 위해  
동등성 연구

지도교수 김 은 희

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함  
2013년 8월

서울대학교 대학원  
에너지시스템공학부  
이 진 한

이진한의 공학석사 학위논문을 인준함  
2013년 8월

위 원 장     김   곤   호     (인)

부위원장     김   은   희     (인)

위     원     심   형   진     (인)

## 초 록

플라즈마의 의학적 응용 연구는 현재 많은 분야에서 다양하게 이루어지고 있다. 그러나 이용에 있어서 플라즈마의 발생량 조절은 임상 결과의 관찰 등과 같은 경험에 의존하고 있으며, 플라즈마의 의학적 응용을 상용화시키기 위해서는 이와 같은 플라즈마 발생량 조절에 보편적인 기준선이 있어야 한다.

본 연구에서는 수산화기(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ )의 생성량을 비교하여 플라즈마의 방사선 동등성을 제시하였고, 이렇게 마련된 방사선 동등성이 실제 세포에 대한 영향 특성에서도 동일하게 나타나는지 확인하였다. 실험 장치로는 X-ray Beam Tube와 분사형 대기압 플라즈마 (APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet) 장치를 선택하였고, 분석에는 DMPO 시약을 활용한 전자스핀공명분광기(Electron Spin Resonance (ESR) spectrometer)를 이용하였다. 세포에 대한 영향 특성 비교는 쥐의 혈관내피세포(mouse endothelial cells, MECs)의 클론형성능 변화(clonogenic cell death)를 관찰하는 방식으로 이루어졌다.

본 연구에서는 증류수를 반응 매질로 하여 화학적 반감기 등과 같은 DMPO-OH radical의 특성 자료를 확보하였으며, 방사선 조사량과 DMPO-OH radical의 생성량의 비례관계를 확인할 수 있었다. 플라즈마 조사량 변화에 따른 DMPO-OH radical의 생성량 관찰에서는 플라즈마 발생 전압과 조사 시간을 높이고 반응 단면적을 넓게 할 때 DMPO-OH radical의 형성이 증가함을 알 수 있었다. 또한 이 과정에서 도출된 APPJ의 X-ray 동등성을 MECs에 대한 클론형성능 제거(clonogenic cell killing) 효과 비교에 사용하였는데, 그 결과 MECs에 대한 APPJ의 효과는 예상보다 낮게 관찰되었다. 이것

은 세포의 클론형성능을 제거하는 요소로 수산화기 외에 다른 인자가 존재하고 있음을 의미한다.

주요어 : APPJ(Atmospheric Pressure Plasma Jet), X-ray, equivalency, OH radical, Electron Spin Resonance, clonogenic cell killing

학 번 : 2010-23343

# 목 차

초 록 .....	i
목 차 .....	iii
표 목 차 .....	vi
그림목차 .....	vii

제 1 장 서 론 .....	1
-----------------	---

제 2 장 배경 이론 .....	4
제 1 절 증류수에서의 수산화물 생성 구조 .....	4
1. X-ray 조사를 통한 수산화물 생성 구조 .....	4
2. 플라즈마 처리를 통한 수산화물 생성 구조 .....	6
제 2 절 수산화물의 정량적 측정 방법 .....	8
1. 형광 탐침을 이용한 수산화물의 정량적 측정 .....	8
2. Fricke dosimetry를 이용한 수산화물의 정량적 측정 .....	11
3. 전자스핀공명분광기를 이용한 수산화물의 정량적 측정 .....	14
제 3 절 클론형성능 제거 효과 .....	18

제 3 장 대상 및 방법 .....	20
제 1 절 DMPO 수용액 .....	20
제 2 절 전자스핀공명분광분석 .....	21
제 3 절 세포와 세포 배양 .....	24
제 4 절 클론형성능 분석 .....	25

제 5 절 X-ray 조사 장치 및 조사 계획 .....	27
1. X-ray 조사에 따른 DMPO-OH radical 특성 분석 실험 ....	27
2. X-ray 조사에 따른 DMPO-OH radical 생성량 분석 실험 ..	29
3. X-ray 조사에 따른 클론형성능 제거 효과 분석 실험 .....	30
제 6 절 플라즈마 조사 장치 및 조사 계획 .....	31
1. 플라즈마 처리 시간에 따른 DMPO-OH radical 생성량 분석 실험 .....	31
2. 헬륨 가스 유속 변화에 따른 DMPO-OH radical 생성량 분석 실험 .....	33
3. 플라즈마 발생 전압에 따른 DMPO-OH radical 생성량 분석 실험 .....	34
4. 플라즈마 처리에 따른 클론형성능 제거 효과 분석 실험 .....	35
 제 4 장 결과 및 분석 .....	 36
제 1 절 DMPO-OH radical의 특성 분석 .....	36
제 2 절 X-ray 조사에 따른 DMPO-OH radical 생성량 분석 .....	41
제 3 절 플라즈마 처리에 따른 DMPO-OH radical 생성량 분석 .....	43
1. 플라즈마 처리 시간에 따른 DMPO-OH radical 생성량 변화 관찰 .....	43
2. 헬륨 가스 유속에 따른 DMPO-OH radical 생성량 변화 관찰 .....	46
3. 플라즈마 발생 전압에 따른 DMPO-OH radical 생성량 변화 관찰 .....	49
제 4 절 X-ray와 플라즈마의 클론형성능 제거 효과 비교 .....	51

제 5 장 결론 .....	54
----------------	----

참고문헌 .....	57
------------	----

Abstract .....	64
----------------	----



## 표 목 차

[표 4-1] X-ray 50Gy를 조사했을 때의 각 실험 별 DMPO-OH signal intensity 초기 값 계산 결과 .....	38
[표 4-2] X-ray 50Gy를 조사했을 때의 시간에 따른 DMPO-OH signal intensity 초기 값 계산 결과 .....	39
[표 4-3] X-ray 조사선량에 따른 DMPO-OH radical의 초기 값 계산 결과 .....	42
[표 4-4] 플라즈마 처리 시간에 따른 DMPO-OH radical의 초기 값 계산 결과 .....	44
[표 4-5] 플라즈마 발생 헬륨 가스 유량 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 값 계산 결과 .....	47
[표 4-6] 플라즈마 발생 전압 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 값 계산 결과 .....	50
[표 4-7] 방사선 조사에 따른 MECs의 생존율 .....	52
[표 4-8] 플라즈마 처리에 따른 MECs의 생존율 .....	52

## 그 림 목 차

[그림 2-1] 증류수의 여기와 이온화에 따른 생성물들 .....	5
[그림 2-2] 3-CCA의 수산화 반응(hydroxylation) 과정 .....	8
[그림 2-3] 7OH-3CCA 농도와 fluorescence peak area 사이의 상관 관계(좌)와 방사선 조사량과 7OH-3CCA의 농도 사이의 상관관계(우) .....	10
[그림 2-4] Fricke 수용액에서의 Fe <sup>3+</sup> 농도 변화 .....	12
[그림 2-5] Spectrophotometer를 통해 얻은 Fe <sup>3+</sup> 농도를 역산하여 얻은 수산기의 농도 그래프 .....	13
[그림 2-6] 전자스핀공명분광기를 통해 얻은 DMPO-OH radical의 intensity 그래프 .....	16
[그림 2-7] DMPO-OH radical의 intensity 그래프를 바탕으로 역산한 DMPO-OH radical의 생성 농도 그래프 .....	17
[그림 3-1] 50 Gy의 X-ray를 조사했을 때 생성된 DMPO-OH radical의 intensity 그래프 .....	23
[그림 4-1] 시간 경과에 따른 DMPO-OH signal intensity 변화 그래프 .....	40

[그림 4-2] 시간 경과에 따른 DMPO-OH signal intensity 초기 값 비교 .....	40
[그림 4-3] X-ray 조사선량 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 intensity 값 변화 .....	42
[그림 4-4] 플라즈마 처리 시간 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 intensity 값 변화 .....	45
[그림 4-5] 플라즈마 발생 헬륨 가스 유량 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 intensity 값 변화 .....	48
[그림 4-6] 플라즈마 발생 전압 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 intensity 변화 .....	50
[그림 4-7] 방사선 및 플라즈마 조사 변화에 따른 MECs에 대한 클론형성능 제거 효과 변화 그래프 .....	53

## 제 1 장 서론

플라즈마의 의학적 응용은 현재까지 다양한 방법으로 연구가 진행되어왔다. 플라즈마로부터 발생하는 열을 사용하는 분야에서는 열 플라즈마(thermal plasma)를 통한 세포조직 제거 및 절개, 살균 및 소독, 조직의 소각 및 부식 작업 연구가 이루어졌고, 플라즈마 처리 과정에서 발생하는 다양한 화학적 반응에 초점을 맞추어 복합적인 효과를 얻고자 하는 분야에서는 저온 플라즈마(non-thermal plasma)를 통한 유전자 변형, 화학적 반응을 통한 상처 치유 및 피부 조직 생성 등에 관한 연구가 진행 중이다.[1,2]

이 중에서도 저온 플라즈마를 통한 플라즈마의 의학적 응용 연구는 현재 가장 많이 연구되는 분야로서 다양한 종류의 플라즈마 생성 장치를 사용하고 있다. 플라즈마 생성을 위한 전극 중 하나를 생물체의 생체조직(living tissue)으로 사용하는 FE-DBD (floating electrode-dielectric barrier discharge) 플라즈마는 동물의 생체 세포 살균과 혈액 응고, 악성 리슈마니아증 (cutaneous Leishmaniasis), 흑색종 피부암 치료에 응용되고 있으며[1], 분사(JET)형 저온 대기압 플라즈마(non-thermal atmospheric pressure plasma)는 치과 의술의 치아 미백 치료에 사용되고 있다.[3]

또한 바늘(needle)형 플라즈마 발생 장치로부터 생성되는 저온 플라즈마는 적은 인체 침습성과 안정성을 바탕으로 nucleoplasty라고 언급되는 새로운 요추간판탈출증(lumbar disc herniation) 치료 방법을 제시하였다. 이 방법은 치료 과정에서 사용되는 저온 플라즈마로부터 물리적 효과와 화학적 효과를 모두 활용하고 있으며, 플라즈마의 의학적 응용 사례 중

에서 상용화가 가장 많이 진행된 분야라고 할 수 있다.[4-6]

이처럼 다양한 목적 아래에서 사용 및 연구되고 있는 각각의 플라즈마들은 플라즈마 발생 장치의 작동 매개 변수 조작을 통해 그 생성량이 경험적으로 조절된다는 공통점을 갖고 있다. 특히나 신체 조사 이후에 나타나는 반응을 바탕으로 인체에 전해지는 효과를 파악하는 플라즈마의 의학적 응용 분야에서는 기초 실험 과정에서부터 작동 매개 변수를 다양하게 조작하면서 기술의 상용화를 위한 기준점을 마련하고 있다.[1,2,4,7] 그리고 이러한 기준점은 기존에 사용되던 다른 기술들의 기준점과 유사한 방식으로 보편성을 확보했을 때 해당 기술의 상용화를 더욱 용이하게 할 수 있다.

현재까지 진행되어온 플라즈마의 의학적 응용 연구 중에서도 플라즈마로부터 유도된 화학적 반응을 활용하는 플라즈마의 의학적 응용 분야에서는 수산화기(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ )가 다른 산화물들에 비해 산화전위(oxidation potential)가 높고 살균력이 강할 뿐만 아니라 항암 효과도 뛰어나다는 점에 착안하여 해당 산화물을 비중 있게 다루고 있음[1,8]을 알 수 있다. 수산화기는 방사선의 의학적 응용 연구에서도 비중 있게 다루어지고 있는데, 알파 입자와 같이 방사선 조사를 통하여 대상 물질의 DNA를 파괴하는 방법이 아닌 방사선 조사로부터 유도되는 화학적인 반응을 통해 효과를 얻는 과정에서 수산화기가 중요한 역할을 하기 때문이다.[9,10]

이렇듯 플라즈마의 의학적 응용 연구와 방사선의 의학적 응용 연구 사이에서 공통적으로 드러나는 수산화기의 중요성은 플라즈마 처리를 통한 수산화기 생성량과 방사선 조사를 통한 수산화기 생성량의 비교 가능성을 암시한다. 그리고 이와 같은 가능성을 바탕으로 플라즈마와 방사선으로부터 생성되는 수산화기의 양을 정량적으로 측정 및 비교하여 플라즈마의 방

사선 동등성을 제시한다면, 실제 치료에 사용되는 플라즈마의 세기가 방사선 치료에서 어느 정도의 영역에 있음을 알 수 있고 이를 통해 앞서 언급한 보편적인 기준점을 구축할 수 있다.

본 연구에서는 이와 같은 플라즈마의 방사선 동등성 연구 필요성을 해결하기 위하여 저온 대기압 플라즈마 발생 장치의 매개 변수 조작을 통한 수산기의 생성량과 X-ray 조사량 조작을 통한 수산기의 생성량을 전자스핀공명분광기(Electron Spin Resonance (ESR) spectrometer)를 통해 정량적으로 분석하였고, 이를 기반으로 증류수에 대한 분사형 대기압 플라즈마(APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet)의 X-ray 동등성을 분석하였다. 본 연구는 또한 쥐의 혈관내피세포(mouse endothelial cells, MECs)에 대한 클론형성능 제거(clonogenic cell killing) 효과를 비교함으로써, 앞의 과정을 통해 분석된 증류수에 대한 APPJ의 X-ray 동등성이 실제로도 유사하게 보이는지에 대해서도 관찰하였다.

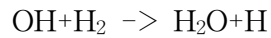
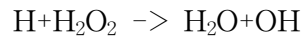
## 제 2 장 배경 이론

### 제 1 절 증류수에서의 수산기 생성 구조

#### 1. X-ray 조사를 통한 수산기 생성 구조

방사선이 물질에 조사되면 물질은 원자 또는 분자와 물리적, 화학적 상호 작용을 일으킨다.[11] 이것은 물과 단백질 등의 물질로 구성된 세포에 대해서도 마찬가지인데, 세포에 방사선이 조사되면 수산기(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ )가 생성되어 세포는 DNA에 직접적인 손상을 입거나 수산기와 주변 물질들 사이의 2차 반응으로부터 직, 간접적인 피해를 받는다.[10,12] 그렇기 때문에 수산기는 방사선의 의학적 응용 연구에서 중요한 인자로 고려되며, 이와 같은 맥락에서 증류수에 대한 방사선 화학 또한 많은 연구가 이루어졌다.

그림 2-1은 증류수에 방사선이 조사되었을 때 발생하는 반응들을 기술한 도표이다. 방사선이 증류수에 조사되면 방사선의 종류에 따라 생성되는 물질의 비율은 다르지만 우선적으로  $10^{-16}$ – $10^{-12}$ 초의 범위에서  $\text{H}_2\text{O}^*$ 와  $\cdot\text{H}$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}^+$ ,  $\text{e}^-$  등이 생성된다. 이때 만들어진 1차 생성물은 주변에 존재하는  $\text{H}_2\text{O}$  및 다른 1차 생성물들과 반응하게 되는데, 이 과정에서  $\text{H}_3\text{O}^+$ 와  $\text{H}_3\text{O}_{\text{aq}}^+$ ,  $\text{e}_{\text{aq}}^-$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  등의 2차, 3차 생성물들이 만들어진다. 이러한 반응은 방사선으로부터 전달된 에너지가 완전히 소모될 때까지 이어지며 그 과정에서 생성물들의 재결합이 발생한다.



위의 반응식은 앞서 언급한 생성물들의 재결합을 표현한 식으로 물에 방사선이 조사된 이후  $10^{-11}$ – $10^{-10}$ 초의 범위에서 완료된다.[11,12]

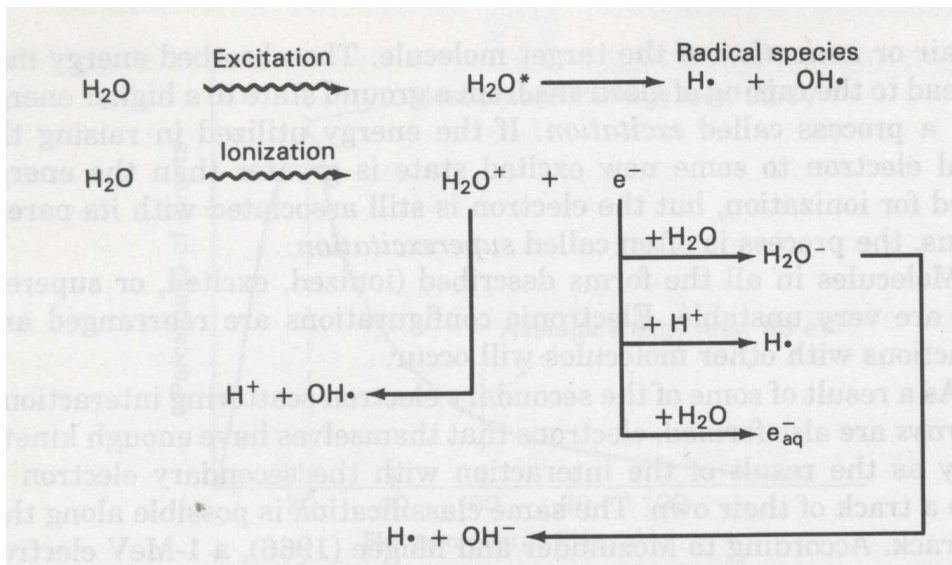


그림 2-1. 증류수의 여기와 이온화에 따른 생성물들. 초기의 물리적 반응 후에 여기되었거나 이온화된 물 분자들은 분해되어 일차 생성물을 생성한다. 이후 이와 같은 생성물들은 물 혹은 수소 이온과 반응하여 위의 도표와 같은 물질들이 된다.[12]



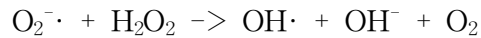
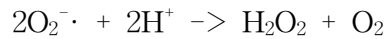
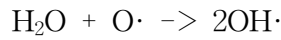
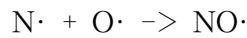
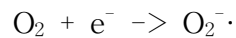
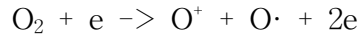
## 2. 플라즈마 처리를 통한 수산기 생성 구조

플라즈마는 고체, 액체, 기체에 이온 물질의 네 번째 상태를 지칭하는 용어로 이 상태에서 물질은 이온화되어 전자와 이온, 중성 입자로 나뉘게 된다. 플라즈마의 종류는 플라즈마 구성 물질의 온도와 밀도에 따라 구분되는데, 최근의 플라즈마의 의학적 응용 연구에는 체감 온도가 낮고 주변 물질과의 화학 반응을 유도하여 다양한 효과를 얻을 수 있는 저온 플라즈마(cold plasma/non-thermal plasma)가 주로 사용된다.[13,14]

위의 저온 플라즈마는 플라즈마 발생 장치의 특성에 따라 다시 물질에 조사하는 방법이 크게 두 종류로 나뉜다. 먼저 유전체장벽(DBD; dielectric barrier discharge) 플라즈마 발생 장치와 같이 플라즈마가 닫힌 구조 안에서 생성되는 경우에는 대상 물질이 플라즈마 영역 안에 놓이면서 플라즈마와 직접 반응을 하거나 플라즈마를 통해 생성된 인자로부터 영향을 받는다. 다음으로 분사형 대기압 플라즈마(APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet)와 같이 생성된 플라즈마가 분사되는 경우에는 대상 물질이 분사된 플라즈마와 반응하여 플라즈마로부터 직, 간접적인 영향을 받는다.[14]

이러한 과정을 거쳐 플라즈마에 조사된 물질은 플라즈마로부터 전달된 이온 및 전자와 화학적인 반응을 일으킨다. 이것은 물과 단백질 등의 물질로 구성된 인체의 경우에서도 마찬가지인데, 인체에 플라즈마가 조사되면 수산기(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ )과 같은 활성 산소종(ROS: Reactive Oxygen Species)이 생성되어 다양한 의학적 효과를 일으킨다.[1,2,8] 그런 만큼 수산기는 플라즈마의 의학적 응용 연구에서 중요한 인자로 고려되며, 같은 맥락에서 증류수에 대한 플라즈마 화학 또한 많은 연구가 이루어졌다.

다음 수식은 본 논문에서 사용한 APPJ 발생 장치의 수산기 생성 과정을 간략히 기술한 것이다.[15-18]



활성 산소종의 빠른 소멸과 상호작용으로 APPJ를 통한 수산기의 생성 과정이 정확하게 밝혀지지 않는 않지만[19], 위의 수식에서 기록된 2차 반응식을 통해 superoxide anion radical( $\cdot\text{O}_2^-$ )로 인하여 생성되는 수산기의 양이 플라즈마 자체로 인해 생성되는 수산기의 양과 비교했을 때 무시할 수 없는 수준이라는 것을 알 수 있다.[18,20]

## 제 2 절 수산기의 정량적 측정 방법

### 1. 형광 탐침을 이용한 수산기의 정량적 측정

형광 탐침(fluorescent probe)을 이용한 수산기(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ )의 정량적 측정은 수산기와 반응하여 형광을 발하는 시약을 사용함으로써 진행된다. 해당 측정법에 사용되는 시약 중 대표적인 것으로는 3-CCA(coumarin-3-carboxylic acid)와 SECCA(succinylated derivative of coumarin) 등이 있으며, 각각은 실험을 통해 생성된 7개의 수산기와 반응하여 7OH-3CCA와 7OH-SECCA 등을 형성한다. 이것은 각 시약에 포함된 coumarin의 벤젠 고리가 수산기와 반응하면서 일어나는 현상이며, 추가적으로 3-CCA에 있는 카르복실기는 각 시약의 수용성을 높게 하여 해당 측정법을 여러 실험에서 다양하게 사용할 수 있도록 한다.[21-24]

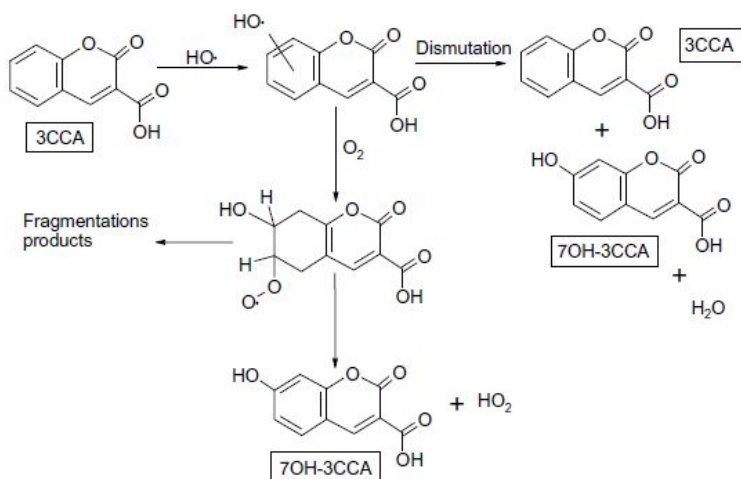


그림 2-2. 3-CCA의 수산화 반응(hydroxylation) 과정[25]

형광 탐침을 이용한 수산기의 구체적인 정량적 측정 방법은 다음과 같다.[24]

- (1) 3-CCA/SECCA와 7OH-3CCA/7OH-SECCA 시약을 구매한다.  
7OH-3CCA /7OH-SECCA 시약은 분석 과정에서의 기준 측정에서  
용된다.
- (2) 실험에 사용할 3-CCA/SECCA를 필요한 농도에 맞추어 수용액으  
로 만든다.
- (3) 용매로는 증류수를 사용하며 실험 과정에서 생성되는 형광 물질이  
pH 농도에 민감하기 때문에 pH 6.8의 phosphate buffer를 첨가한  
다.
- (4) 위의 절차에 따라 준비된 수용액을 대상으로 실험을 진행한다.
- (5) 실험을 통해 생성된 7OH-3CCA/7OH-SECCA는 fluorescence  
spectroscopy와 reverse phase column이 장착된 고성능액체크로마  
토그래피(HPLC; High Performance Liquid Chromatography)를 통  
해 정량적으로 분석된다.

그림 2-3은 위의 과정을 통해 얻은 실제 7OH-3CCA의 fluorescence  
peak 그래프이며, 해당 생성물의 농도를 계산하는 과정이 나타나 있다.

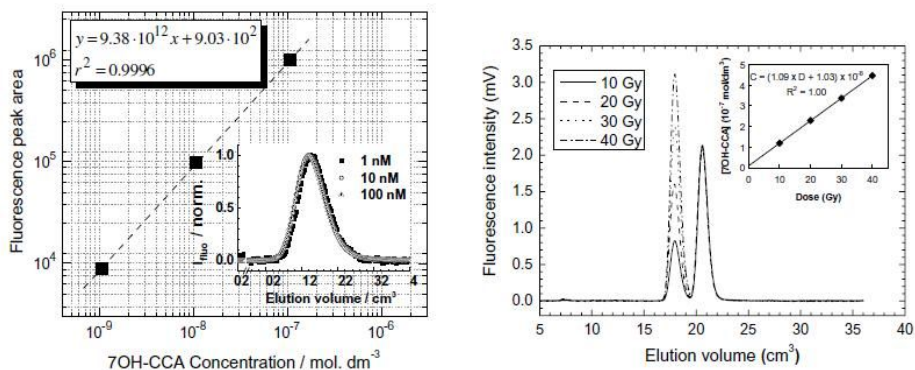
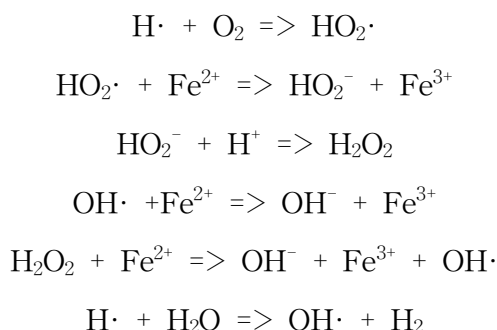


그림 2-3. 7OH-3CCA 농도와 fluorescence peak area 사이의 상관관계(좌)와 방사선 조사량과 7OH-3CCA의 농도 사이의 상관관계(우). 좌측의 그래프는 구매한 7OH-3CCA를 사용하여 구한 7OH-3CCA의 보정 그래프이며, 우측의 그래프는 좌측의 그래프를 바탕으로 실험을 통해 생성된 7OH-3CCA의 양을 분석한 그래프이다.[25]

## 2. Fricke Dosimetry를 이용한 수산기의 정량적 측정

Fricke Dosimetry는 제 1철 이온 (oxidation of ferrous ion,  $\text{Fe}^{2+}$ ) 수용액에 방사선을 조사하였을 때  $\text{Fe}^{2+}$ 가 쉽게 제 2철 이온(ferric ion,  $\text{Fe}^{3+}$ )으로 전환된다는 특징을 응용한 화학적 방사선 조사량 측정법이다.  $\text{Fe}^{2+}$ 는 물에 방사선을 조사하였을 때 발생하는 다양한 활성 산소종과 반응하여 Fricke dosimeter 측정법에서 일종의 포착제(scavenger) 역할을 하는데, 다음의 수식은 그 과정을 나타낸 것이다.[11,12]



위의 수식을 보면 방사선 조사를 통해 생성된  $\text{Fe}^{3+}$ 는 세 종류가 있는데, 그 중에서도 수산기(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ )에 의해 생성된  $\text{Fe}^{3+}$ 는 전체  $\text{Fe}^{3+}$  생성량 중 사분의 일의 비율로 존재하고 있음을 알 수 있다. 그리고 이와 같은  $\text{Fe}^{3+}$  생성량 비율은 실험을 통해 생성된 수산기의 정량적 측정을 가능하게 한다. Fricke dosimetry를 이용하여  $\text{Fe}^{3+}$ 의 농도를 정량적으로 측정하면 위의 생성량 비율을 근거로 그 값의 사분의 일을 수산기의 농도로 고려할 수 있는 것이다. Fricke Dosimetry를 이용한 수산기의 구체적인 정량적 측정 방법은 다음과 같다.[26,27]

(1) 실험에 사용할 Fricke 수용액을 준비한다.

시약에 포함되어야 할 성분으로는  $\text{FeSO}_4$ 와 sulfuric acid, NaCl 등이 있다.

(2) 준비된 Fricke 수용액을 사용하고자 하는 실험 장치로 조사한다.

(3) 조사가 완료된 시약은 spectrophotometer를 통해 철 이온의 농도를 측정 및 계산한다.

그림 2-4는 spectrophotometer를 통해 측정한 철 이온의 농도를 나타낸 그래프이다.

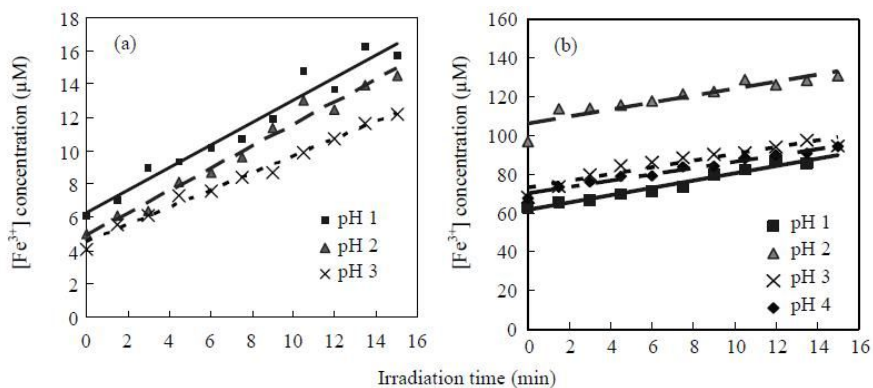


그림 2-4. Fricke 수용액에서의  $\text{Fe}^{3+}$  농도 변화. 좌측(a)의 그래프는 초기의 Fricke 수용액에 제 2철의 농도가 낮았을 때이며, 우측(b)의 그래프는 초기의 Fricke 수용액에 제 2철의 농도가 높았을 때이다. 각 시약은 초음파(ultrasonic)로 조사하였다.[27]

(4) 측정된  $\text{Fe}^{3+}$  농도를 바탕으로 수산기의 농도를 역산한다.

그림 2-5는 역산한 수산기의 농도를 나타낸 그래프이다.

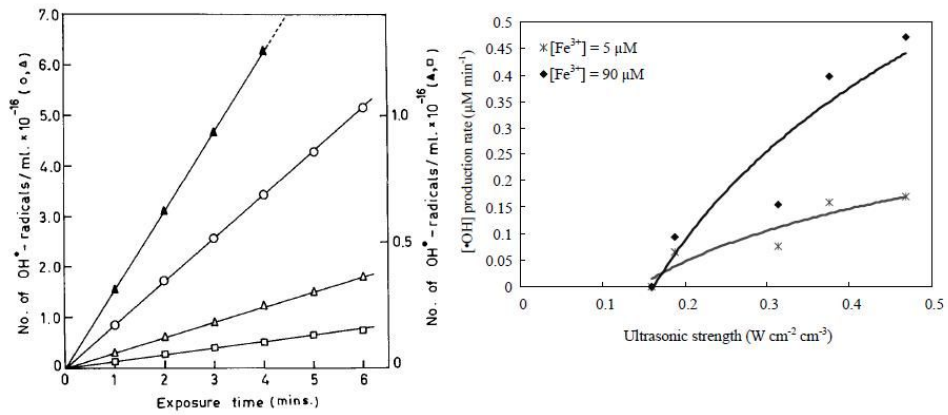


그림 2-5. Spectrophotometer를 통해 얻은  $\text{Fe}^{3+}$  농도를 역산하여 얻은 수산기의 농도 그래프. 좌측의 그래프는 X-ray 조사 장치와 초음파 조사 장치를 사용하였고,[26] 우측의 조사 장치는 그림 2-4와 동일한 장치를 사용하였다.[27]

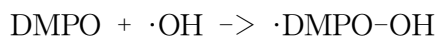
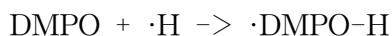


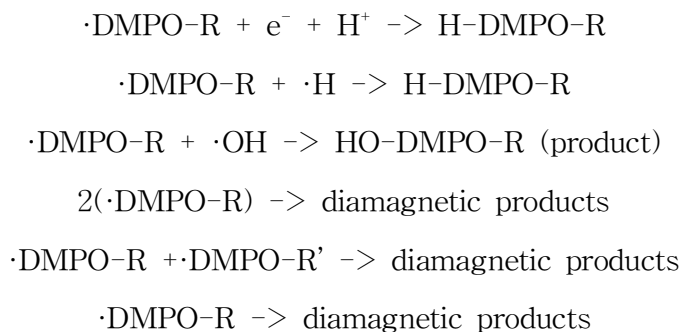
### 3. 전자스핀공명분광기를 이용한 수산기의 정량적 측정

전자스핀공명분광분석(Electron Spin Resonance (ESR) spectrometry)은 물체를 구성하는 전자가 물체의 구조에 따라 서로 다른 electron spin state를 가진다는 성질을 이용하여 물체의 종류를 파악하는 측정법이다. 전자스핀공명분광기는 물질의 분석 과정에서 물체의 원자를 구성하는 전자에 강한 자기장을 거는데, 이것을 통해 측정 물질의 전자가 공명하게 되는 자기장의 범위가 파악된다. 이렇게 파악된 자기장의 범위는 electron spin state의 범위를 나타내며, 이 수치는 물질에 따라 고유하기 때문에 측정값을 바탕으로 분석한 물질이 무엇인지 판단할 수 있다.[28]

전자스핀공명분광기를 이용한 수산기(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ )의 측정에서 수산기는 짧은 존재 기간(lifetime) 때문에 직접 분석되기는 힘들다. 그래서 전자스핀공명분광기를 이용한 수산기의 분석에는 수산기의 반감기를 길게 해주는 spin trap 물질이 사용되며, 그 중 대표적인 시약으로는 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO)와 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide(DEMPO)가 있다.[29-32]

이 중에서도 DMPO는 전자스핀공명분광분석을 사용한 수산기의 정량, 정성적 분석에 가장 많이 사용되는 시약이며, 다음은 DMPO 수용액에 gamma radiation이 조사되었을 때 발생하는 반응들을 기록한 수식이다.[30]





위의 수식을 보면 DMPO 수용액에 방사선이 조사되었을 때 DMPO 분자와 다양한 활성 산소종(ROS: Reactive Oxygen Species)이 결합하는 것을 볼 수 있는데, 전자스핀공명분광분석은 해당 DMPO adduct의 양을 정량, 정성적으로 측정하면서 원하는 활성 산소종의 생성량을 파악하게 한다. 같은 맥락에서 수산기의 정량, 정성적인 측정에는 DMPO-OH가 분석에 알맞은 DMPO adduct로 고려되고 있으며, 현재 해당 adduct는 870초의 반감기를 갖고 있는 것으로 알려져 있다.[18] 전자스핀공명분광 분석을 이용한 수산기의 구체적인 정량적 측정 방법은 다음과 같다.[33]

(1) 실험에 사용할 DMPO 수용액을 준비한다.

시약을 통해 수산기의 농도를 바로 계산하고자 한다면 반응식이 구체적으로 알려진 시약을 첨가하여 수산기 생성량 역산을 위한 기준점을 마련한다.

(2) 준비된 DMPO 수용액을 사용하고자 하는 실험 장치로 조사한다.

(3) 조사가 완료된 시약은 전자스핀공명분광기를 통해 DMPO adduct의 intensity를 측정한다. 그림 2-6은 해당 adduct들의 intensity를

측정한 그래프이다.

- (4) 수산기의 정량적인 측정은 그림 2-6과 같은 DMPO adduct의 intensity를 기준으로 (1)에서 첨가된 시약의 반응 농도에 따른 수산기의 발생 농도를 계산하여 구한다.

그림 2-7은 역산한 수산기의 농도를 나타낸 그래프이다.

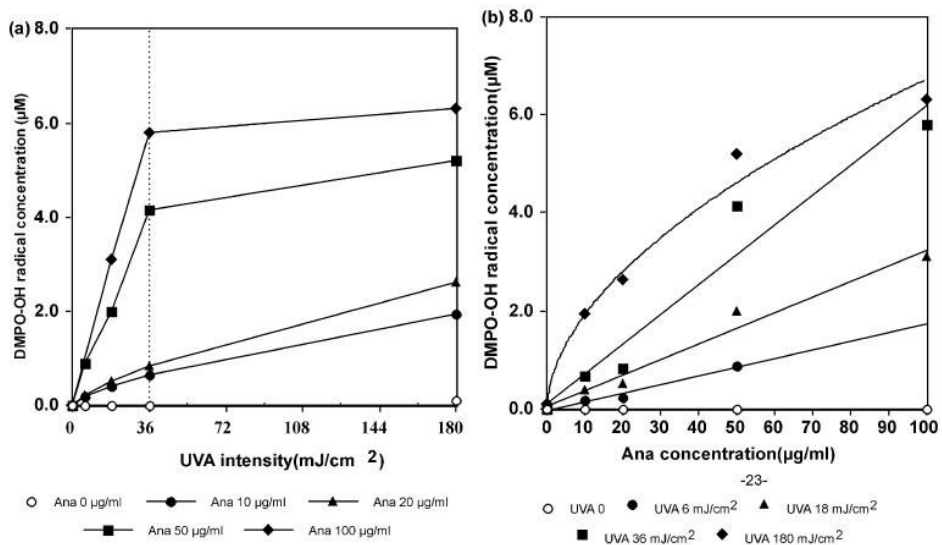


그림 2-6. 전자스핀공명분광기를 통해 얻은 DMPO-OH radical의 intensity 그래프. 가운데의 네 가지 피크가 DMPO-OH를 나타내며, 양 끝의 두 가지 피크는 intensity 그래프의 보편적인 기준점이 된다. 위의 intensity 그래프는 시간에 따라 피크 값이 감소하며, 해당 그래프의 x 축(자기장 영역)은 330부터 350 mT 이다.[33,34]

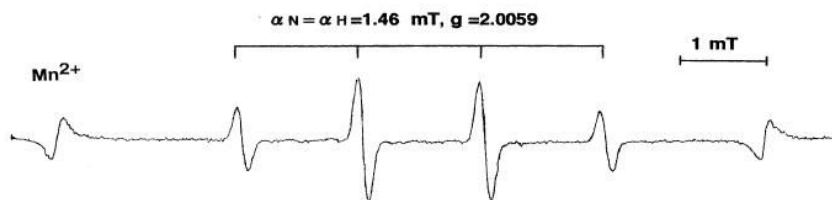


그림 2-7. DMPO-OH radical의 intensity 그래프를 바탕으로 역산한 DMPO-OH radical의 생성 농도 그래프. 좌측의 그래프는 UVA 조사량에 따른 DMPO-OH radical의 생성량을 나타냈으며, 우측의 그래프는  $TiO_2$  농도 변화에 따른 DMPO-OH radical의 생성량을 나타냈다.[33]

### 제 3 절 클론형성능 제거 효과

클론형성능 분석 혹은 군체형성 분석(colony formation assay)은 군체(colony) 안에서의 단일 세포의 성장 능력을 기반으로 한 생체 외(in vitro) 형태의 세포 생존을 분석 방법이다. 여기에서 군체는 최소 50개의 세포로 구성된 집단으로 정의한다. 클론형성능 분석은 주로 이온 방사선(ionizing radiation)의 조사 이후에 세포의 재생 능력이 유지되는지 여부를 판단하기 위해 사용하는데, 이 외에 다른 종류의 세포 독성 물질(cytotoxic agents)의 효과 파악에도 사용된다. 생존된 분류(fraction)을 평가하는 기준은 다른 군체를 생성할 수 있는가에만 두고 있으며, 세포들은 실험 이전 혹은 이후에 적절하게 희석된 상태로 1-3주 동안 새로운 군체를 생성하도록 분배(seeded)된다. 군체의 집계는 세포를 염색한 후에 세포 측정기(cell counter)나 현미경 등을 사용하여 진행된다. 또한 이렇게 집계된 수치는 실험 조건에 따른 생존 곡선(survival curve)을 구하는 과정에 사용되고,[35] 이것을 바탕으로 조사 장치의 클론형성능 제거(clonogenic cell killing) 효과를 분석하게 된다. 다음은 클론형성능 제거 효과를 분석하기 위해 사용하는 수식이다. 다음의 수식에서 수득율이란 배양된 세포 중에서 군체를 생성한 세포의 비율을 나타내는 용어로, 세포의 생육율(viability)를 판단하는 척도가 된다.

대조군 세포의 군체 수득율 계산 방법

$$\text{Plating Efficiency (PE)} = \frac{\text{Count}}{\text{Cells seeds}} \times 100\%$$

실험군 세포의 군체 수득율 계산 방법

$$\text{Survival Fraction (SF)} = \frac{\text{Count}}{\text{Cells seeds} \times PE}$$

위의 수식에서 Count는 생성된 군체의 숫자(number of colonies formed)를 의미한다.[36]

## 제 3 장 대상 및 방법

### 제 1 절 DMPO 수용액

앞서 배경이론에서 언급한 수산화기(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ )의 정량적 측정 방법 중에서 플라즈마 조사를 통한 수산화기의 정량적 측정 연구와 방사선 조사를 통한 수산화기의 정량적 측정 연구 모두에 보고된 방법은 전자스핀공명분광분석(Electron Spin Resonance (ESR) spectrometry)이 유일하였다. 그래서 본 연구는 수산화기의 정량적 측정 방법으로 전자스핀 공명분광분석을 선택하였고, 해당 분석법을 수행하기 위해 필요한 DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) 시약을 시그마 알드리치 코리아(D5766)에서 구매하였다.

구매한 DMPO는 수용액으로 만들기 전까지 영하 20 °C의 냉동실에 냉동 보관하였으며, DMPO 수용액은 USF ELGA의 GB/PURELAB Ultra Genetic Prima 3으로 증류된 증류수를 용매로 하여 만들었다. 실험에 사용하는 DMPO 수용액의 농도는 100 mM이며, 수용액의 보관은 BD Falcon™ 사의 50 ml polypropylene conical tube에 담아 4 °C의 냉장실에 밀폐 보관하였다.

방사선 및 플라즈마 조사 실험 시에는 보관된 DMPO 수용액 중 2 ml 를 실험용 용기에 담아 사용했는데, 이 과정에서 DMPO 수용액의 분배는 클린 벤치에서 진행되었다. 또한 실험용 용기로는 STARLAB에서 제조한 2.0 ml Natural Flat Cap Microcentrifuge Tube를 일회로 사용하였다.

## 제 2 절 전자스핀공명분광분석

본 연구에서는 수산화기(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ )의 정량적 측정을 위해 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)의 핵자기공명분광기실에 속한 전자스핀공명분광기(Electron Spin Resonance (ESR) spectrometer; JES-TE200, JEOL, Tokyo, 1999)를 사용하였다. 사용된 전자스핀공명분광기의 작동 조건으로는  $341.0\text{mT} \pm 10\text{mT}$ 의 external magnetic field와 출력(power) 1mW, 주파수 9.42GHz의 마이크로파(microwave)가 설정되었다. DMPO 수용액의 분석 소요 시간(sweep time)은 2분이었으며, DMPO adduct의 intensity 크기(amplitude)는 방사선 조사 실험에서는 (2.0, 2), 플라즈마 조사 실험에서는 (1.2, 1)로 설정되었다. 이는 각 조사 장치에 따른 DMPO adduct의 intensity가 큰 차이를 보여 그에 따른 차이를 보정하기 위함이다. 그림 3-1은 이와 같은 설정을 통해 얻은 DMPO-OH radical의 intensity 그래프이다.

다음은 그림 3-1의 분석 방법이다. 본 연구는 DMPO의 용매를 증류수로 하여 방사선(X-ray)에 대한 플라즈마(APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet)의 동등성을 제시하고자 하였기 때문에 배경이론에서 언급한 것처럼 전자스핀공명분광분석을 사용하여 생성된 수산화기의 양 자체를 정량 측정하지 않고 각각의 장치를 통해 생성된 DMPO-OH radical의 농도를 정량적으로 비교하였다.

실험을 통해 생성된 DMPO-OH radical의 정량적인 농도 비교는 그림 3-1에도 표시된 Mn marker를 기준으로 진행하였다. Mn marker는 모든 실험에 대해 동일한 양의 Mn을 넣음으로써 나타나는 값이기 때문에 그래프에서 나타나는 Mn peak는 모두 같은 양을 의미하는데, 이를 바탕으로



로 하여 각 그래프 차이의 오차율( $\frac{Mn Peak Value of Experimental Group}{Mn Peak Value of Control Group}$ )을 구하고 그것을 측정된 intensity에 곱하였다. 이 계산은 DMPO-OH radical이 전산 신호(electric signal)로 표현되는 과정에서 발생하는 오차를 보정하게 되는데, 이렇게 보정된 intensity 그래프들은 분석에 동일성을 갖게 된다.

위와 같은 intensity 그래프 보정 작업이 끝나면 DMPO-OH radical을 의미하는 네 개의 peak 값 분석을 시작한다. 위의 네 개의 peak는 1:2:2:1의 비율을 유지하고 있는데, DMPO-OH radical의 농도가 질을수록 peak의 intensity 또한 비례하여 높아진다.[29-32] 그러므로 각 peak의 절댓값을 더하여 DMPO-OH radical의 농도 변화를 관찰하였으며, 이것을 다시 중앙의 두, 세 번째 peak 값과 전체 peak 값의 합으로 나누어 관찰하였다. 이는 DMPO-OH radical의 첫 번째와 네 번째 peak가 두 번째와 세 번째 peak에 비해 electric signal noise의 영향을 더 많이 받기 때문에 그에 따른 차이를 구분하기 위해서이다.

또한 DMPO-OH radical은 앞서 배경이론에서 언급한 것처럼 870초의 반감기를 갖는데, 본 연구에서는 그와 같은 반감기를 고려하여 시간 경과에 따른 intensity 감소폭을  $y = A_0 e^{-\lambda t}$  식으로 역산하여 보강하였다.

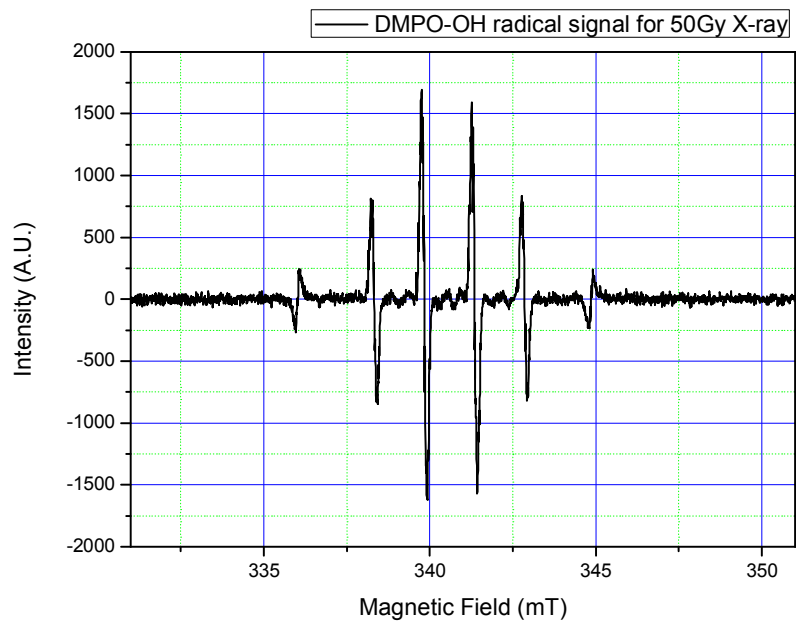


그림 3-1. 50 Gy의 X-ray를 조사했을 때 생성된 DMPO-OH radical의 intensity 그래프. 좌우의 peak는 intensity 그래프의 표지(marker)가 되는 Mn이며, 중앙에 위치한 네 쌍의 peak는 DMPO-OH radical을 의미한다.

### 제 3 절 세포와 세포 배양

본 연구에서는 DMPO-OH radical 생성 비율을 통해 제시한 플라즈마 (APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet)의 방사선(X-ray) 동등성이 실제 세포에도 유사하게 적용되는지를 확인하기 위해 세포 조사 실험을 계획하였다. 해당 실험에는 쥐의 혈관내피세포(mouse endothelial cells, MECs; ATCC, CRL-2161)가 사용되었으며, 세포는 다음의 조건에 맞추어 배양하였다.

먼저 세포 배양액은 FBS (GIBCO) 10%와 DMEM (ATCC) 90%의 비율에 맞추어 준비하였다. 또한 실험에 사용된 세포는 모두 T-25 culture Flask(NUNC)에 담아 CO<sub>2</sub> 농도 10%, 온도 37 °C 조건의 세포 배양기(incubator; SANYO)에서 배양되었다. 세포 배양액은 세포의 생존 조건을 일정하게 유지할 수 있도록 주기적(3, 4일마다)으로 교체하였고, T-25 culture Flask의 표면의 3/4 정도가 세포로 덮이면 새로운 T-25 culture Flask에 세포를 재 배양(sub-culturing)하였다. 이와 같은 과정을 거친 세포들은 실험에 사용하기 위해 고마 바이오텍에서 판매하는 MUSE Cell Analyzer를 통하여 개체화하였다.

## 제 4 절 클론형성능 분석

본 연구에서는 DMPO-OH radical 생성 비율을 통해 제시한 플라즈마 (APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet)의 방사선(X-ray) 동등성이 실제 세포에도 유사하게 적용되는지 확인하기 위한 실험으로 쥐의 혈관 내피세포(mouse endothelial cells, MECs; ATCC, CRL-2161)에 대한 방사선과 플라즈마의 클론형성능 제거(clonogenic cell killing) 효과 비교 실험을 진행하였다. 실험 결과의 분석 방법으로는 클론형성능 분석을 바탕으로 한 세포의 생존율(survival fraction) 측정을 선택하였으며, 실험의 진행은 아래와 같이 진행했다.

먼저 대조군의 생성을 위해 아무런 처리를 하지 않은 MECs를 대상 및 방법의 제 3절에서 기술한 방법에 따라 배양하였다. 대조군의 배양이 완료되면 배경이론의 제 3절에서 기술한 Plating Efficiency를 계산하고 기록하였다.

다음은 방사선과 플라즈마 처리를 한 MECs의 배양이다. MECs에 조사되는 방사선과 플라즈마의 정보는 제 5절과 제 6절에서 구체적으로 서술하겠으며, 각각의 처리가 완료된 MECs는 세포 회복 시간을 두지 않고 앞서의 대조군과 마찬가지로 대상 및 방법의 제 3절에서 기술한 방법에 따라 배양되었다. 다만 이 과정에서 조사된 세포의 배양 용기로는 실험의 효율성을 고려하여 60 mm culture dish (NUNC)가 사용되었다. 이와 같은 순서로 실험군의 배양이 완료되면 실험군은 배경이론의 제 3절에서 기술한 세포의 생존율(Surviving Fraction)식에 따라 분석되었다.

위의 과정들에서 각각의 세포들은 군체(colony)를 형성하게 되며, 클론형성능 제거 효과 비교 실험에서 이러한 군체의 계측(count)은 필수적인 요소가 된다. 다음은 이와 같은 군체의 계측 과정이다. 우선 조사된

세포들이 육안으로 관측될 정도로 군체를 형성하면 세포 배양액을 제거하고 PBS(Phosphate buffered saline)로 세척한다. 세척이 완료되면 70% 에탄올 3 ml를 넣고 실온에서 5분 동안 보존하여 세포를 고정시킨다. 고정이 완료되면 에탄올을 제거하고, 20배로 희석된 Giemsa 용액(시그마 알드리치, 48900) 3 ml를 넣고 실온에서 40분 동안 보존하여 군체를 염색시킨다. 염색된 군체는 증류수로 세척되며, 세척이 완료되면 digiter colony counter (Kastech, KT0074A)을 이용하여 군체를 계측한다. 군체의 계측은 blind count로 실행되며, 군체의 수가 너무 적거나 너무 많은 경우에는 통계에서 제외하였다.

## 제 5 절 X-ray 조사 장치 및 조사 계획

본 연구에서 사용한 X-ray는 YXLON Y.TU 450 - D08 X-ray beam tube로부터 발생되었다. 가동 조건으로는 450 kVp, 10mA를 설정하였으며, 방사선 조사선량은 Gafchromic EBT Film을 이용하여 교정하였다. X-ray에 조사된 EBT Film은 EPSON scanner(Epson Expression 10000 XL)를 이용하여 분석하였고, 450 kVp, 10mA의 가동 조건에서 6.078 Gy/min의 선량률(dose rate)을 보였다.

### 1. X-ray 조사에 따른 DMPO-OH radical 특성 분석 실험

이번 실험은 배경 이론에서 언급한 DMPO-OH radical의 반감기와 기본적인 특성 등이 실제로도 일치하는지 확인하기 위해 기획되었다. 실험 대상으로는 대상 및 방법 제 1절에서 언급한 방법에 따라 만들어진 100 mM DMPO 수용액 2 ml가 사용되었으며, 방사선 조사 장치는 450 kVp, 10mA의 가동 조건에서 8분 20초 동안 운전되어 약 50 Gy의 X-ray를 발생시켰다.

해당 실험은 동일한 조건에서 세 번 반복되었으며, 이렇게 조사된 DMPO 수용액은 대상 및 방법 제 2절에서 언급한 것처럼 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)의 핵자기공명분광기실 소유의 전자스핀 공명분광기(Electron Spin Resonance (ESR) spectrometer; JES-TE200, JEOL, Tokyo, 1999)를 통해 분석되었다. 수용액의 정확한 분석은 X-ray 조사실과 핵자기공명분광기실의 물리적인 거리 차이로 인하여 X-ray 조사가 완료되고 6분, 9분 12분이 지났을 때에 본격적으로 시작되었고, 이

과정을 통해 DMPO-OH radical의 intensity가 측정되었다.

측정이 완료된 DMPO-OH radical의 intensity 정보는 텍스트 파일 형태로 공급되었으며, 이렇게 얻어진 데이터는 제 3장 대상 및 방법 2절에서 언급한 방법에 따라 Microsoft Office Excel과 Origin Pro 8을 통해 분석되었다.

## 2. X-ray 조사에 따른 DMPO-OH radical 생성량 분석 실험

이번 실험은 X-ray 조사량에 따른 DMPO-OH radical의 생성량 변화를 정량적으로 관찰하기 위해 기획되었다. 실험 대상으로는 대상 및 방법 제 1절에서 언급한 방법에 따라 만들어진 100 mM DMPO 수용액 2 ml가 사용되었으며, 방사선 조사 장치는 450 kVp, 10mA의 가동 조건에서 방사선 조사 시간을 바꾸어 2 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 20 Gy, 35 Gy, 50 Gy의 X-ray를 발생시켰다.

해당 실험은 동일한 조건에 대해서 세 번에서 다섯 번 반복되었으며, 이렇게 조사된 DMPO 수용액은 대상 및 방법 제 2절에서 언급한 것처럼 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)의 핵자기공명분광기실 소유의 전자스핀공명분광기(Electron Spin Resonance (ESR) spectrometer; JES-TE200, JEOL, Tokyo, 1999)를 통해 분석되었다. 수용액의 정확한 분석은 X-ray 조사실과 핵자기공명분광기실의 물리적인 거리 차이로 인하여 X-ray 조사가 완료되고 6분, 9분 12분이 지났을 때에 본격적으로 시작되었고, 이 과정을 통해 DMPO-OH radical의 intensity가 측정되었다.

측정이 완료된 DMPO-OH radical의 intensity 정보는 텍스트 파일 형태로 공급되었으며, 이렇게 얻어진 데이터는 제 3장 대상 및 방법 2절에서 언급한 방법에 따라 Microsoft Office Excel과 Origin Pro 8을 통해 분석되었다.



### 3. X-ray 조사에 따른 클론형성능 제거 효과 분석 실험

이번 실험은 쥐의 혈관내피세포(mouse endothelial cells, MECs; ATCC, CRL-2161)에 대한 X-ray의 클론형성능 제거 효과를 관찰하기 위해 기획되었다. 실험 대상은 MECs가 되겠으며, 방사선 조사 장치는 450 kVp, 10mA의 가동 조건에서 방사선 조사 시간을 바꾸어 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, 10 Gy의 X-ray를 발생시켰다.

실험에 사용되는 MECs는 대상 및 방법 제 3절에서 언급한 방법에 따라 배양되었고, 배양된 세포는 60 mm culture dish (NUNC)에서 설정된 조사선량만큼의 방사선을 조사받았다. 실험은 동일한 조건에서 세 번 반복되었으며, 조사된 세포들은 대상 및 방법 제 4절에서 언급한 방법대로 다시 배양되었다.

조사 후 배양된 세포들은 배경이론의 제 3절에서 서술한 세포의 생존율(survival fraction) 계산을 통해 분석되었으며, 이렇게 정리된 데이터는 Origin Pro 8을 통해 방사선 조사에 따른 세포의 생존율 변화 경향 분석에 사용되었다.

## 제 6 절 플라즈마 조사 장치 및 조사 계획

본 연구에서 사용한 플라즈마는 서울대학교 플라즈마 응용 연구실 (PAL)에 소속된 분사형 대기압 플라즈마(APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet) 장치가 사용되었다. 해당 플라즈마 장치는 RF frequency를 15 kHz로 고정한 상태로 운전하였으며, 플라즈마 세기는 플라즈마 발생 전압과 헬륨 가스 유속, 그리고 플라즈마 조사 시간 변경을 통해 조절하였다.

### 1. 플라즈마 처리 시간에 따른 DMPO-OH radical 생성량 분석 실험

이번 실험은 플라즈마 처리 시간 변화에 따른 DMPO-OH radical의 생성량 변화를 정량적으로 관찰하기 위해 기획되었다. 실험 대상으로는 대상 및 방법 제 1절에서 언급한 방법에 따라 만들어진 100 mM DMPO 수용액 2 ml가 사용되었으며, 분사형 대기압 플라즈마(APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet) 장치의 운전 조건으로는 RF frequency 15 kHz, 플라즈마 발생 전압 5.5 V<sub>p</sub>, 헬륨 가스 유속 1 LPM(liter per minute)이 설정되었다. 또한 DMPO 수용액에 대한 APPJ 플라즈마 처리 시간은 1분, 2분, 3분, 4분, 5분으로 구분하였다.

해당 실험은 동일한 조건에 대해서 세 번에서 다섯 번 반복되었으며, 이렇게 조사된 DMPO 수용액은 대상 및 방법 제 2절에서 언급한 것처럼 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)의 핵자기공명분광기실에 속한 전자스핀공명분광기(Electron Spin Resonance (ESR) spectrometer;

JES-TE200, JEOL, Tokyo, 1999)를 통해 분석되었다. 수용액의 정확한 분석은 플라즈마 응용 연구실과 핵자기공명분광기실의 물리적인 거리 차이로 인하여 플라즈마 처리가 완료되고 6분, 9분 12분이 지났을 때에 본격적으로 시작되었고, 이 과정을 통해 DMPO-OH radical의 intensity가 측정되었다.

측정이 완료된 DMPO-OH radical의 intensity 정보는 텍스트 파일 형태로 공급되었으며, 이렇게 얻어진 데이터는 제 3장 대상 및 방법 2절에서 언급한 방법에 따라 Microsoft Office Excel과 Origin Pro 8을 통해 분석되었다.

## 2. 헬륨 가스 유속 변화에 따른 DMPO-OH radical 생성량 분석 실험

이번 실험은 플라즈마 생성에 필요한 헬륨 가스의 유속 변화에 따른 DMPO-OH radical의 생성량 변화를 정량적으로 관찰하기 위해 기획되었다. 실험 대상으로는 대상 및 방법 제 1절에서 언급한 방법에 따라 만들어진 100 mM DMPO 수용액 2 ml가 사용되었으며, 분사형 대기압 플라즈마(APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet) 장치의 운전 조건으로는 RF frequency 15 kHz, 플라즈마 발생 전압 5.5 Vp, 플라즈마 조사 시간 2분이 설정되었다. 또한 플라즈마 생성에 필요한 헬륨 가스의 유속은 1 LPM(liter per minut), 1.5 LPM, 2LPM으로 구분하였다.

해당 실험은 동일한 조건에 대해서 세 번에서 네 번 반복되었으며, 이렇게 조사된 DMPO 수용액은 대상 및 방법 제 2절에서 언급한 것처럼 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)의 핵자기공명분광기실에 속한 전자스핀공명분광기(Electron Spin Resonance (ESR) spectrometer; JES-TE200, JEOL, Tokyo, 1999)를 통해 분석되었다. 수용액의 정확한 분석은 플라즈마 응용 연구실과 핵자기공명분광기실의 물리적인 거리 차이로 인하여 플라즈마 처리가 완료되고 6분, 9분 12분이 지났을 때에 본격적으로 시작되었고, 이 과정을 통해 DMPO-OH radical의 intensity가 측정되었다.

측정이 완료된 DMPO-OH radical의 intensity 정보는 텍스트 파일 형태로 공급되었으며, 이렇게 얻어진 데이터는 제 3장 대상 및 방법 2절에서 언급한 방법에 따라 Microsoft Office Excel과 Origin Pro 8을 통해 분석되었다.

### 3. 플라즈마 발생 전압 변화에 따른 DMPO-OH radical 생성량 분석 실험

이번 실험은 플라즈마 발생 전압 변화에 따른 DMPO-OH radical의 생성량 변화를 정량적으로 관찰하기 위해 기획되었다. 실험 대상으로는 대상 및 방법 제 1절에서 언급한 방법에 따라 만들어진 100 mM DMPO 수용액 2 ml가 사용되었으며, 분사형 대기압 플라즈마(APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet) 장치의 운전 조건으로는 RF frequency 15 kHz, 헬륨 가스 유속 1 LPM(liter per minute), 플라즈마 조사 시간 2분이 설정되었다. 또한 APPJ 플라즈마 발생 전압은 2.5 Vp, 3.5 Vp, 4.5 Vp, 5.5 Vp로 구분하였다.

해당 실험은 동일한 조건에 대해서 세 번에서 네 번 반복되었으며, 이렇게 조사된 DMPO 수용액은 대상 및 방법 제 2절에서 언급한 것처럼 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)의 핵자기공명분광기실에 속한 전자스핀공명분광기(Electron Spin Resonance (ESR) spectrometer; JES-TE200, JEOL, Tokyo, 1999)를 통해 분석되었다. 수용액의 정확한 분석은 플라즈마 응용 연구실과 핵자기공명분광기실의 물리적인 거리 차이로 인하여 플라즈마 처리가 완료되고 6분, 9분 12분이 지났을 때에 본격적으로 시작되었고, 이 과정을 통해 DMPO-OH radical의 intensity가 측정되었다.

측정이 완료된 DMPO-OH radical의 intensity 정보는 텍스트 파일 형태로 공급되었으며, 이렇게 얻어진 데이터는 제 3장 대상 및 방법 2절에서 언급한 방법에 따라 Microsoft Office Excel과 Origin Pro 8을 통해 분석되었다.

#### 4. 플라즈마 처리에 따른 클론형성능 제거 효과 분석 실험

이번 실험은 쥐의 혈관내피세포(mouse endothelial cells, MECs; ATCC, CRL-2161)에 대한 플라즈마의 클론형성능 제거 효과를 관찰하기 위해 기획되었다. 실험 대상은 MECs가 되겠으며, 플라즈마 조사 장치는 RF frequency 15 kHz, 플라즈마 발생 전압 2.5 Vp, 헬륨 가스 유속 1 LPM(liter per minute)의 조건에서 1분, 2분, 3분의 운전 시간 동안 플라즈마를 발생시켰다.

실험에 사용되는 MECs는 대상 및 방법 제 3절에서 언급한 방법에 따라 배양되었고, 배양된 세포는 2.0 ml Natural Flat Cap Microcentrifuge Tube(STARLAB)에 담겨 설정된 양만큼의 플라즈마 처리를 받았다. 이번 실험에서 2.0 ml tube를 사용한 이유는 플라즈마 발생장치의 구조가 반응 면적이 넓고 깊이가 얇은 dish에서보다 반응 면적이 좁고 깊이가 깊은 tube에 더욱 적합하기 때문이었다. 실험은 동일한 조건에서 세 번 반복되었으며, 조사된 세포들은 대상 및 방법 제 4절에서 언급한 방법대로 다시 배양되었다.

조사 후 배양된 세포들은 배경이론의 제 3절에서 서술한 세포의 생존율(survival fraction) 계산을 통해 분석되었으며, 이렇게 정리된 데이터는 Origin Pro 8을 통해 방사선 조사에 따른 세포의 생존율 변화 경향 분석에 사용되었다.

## 제 4 장 결과 및 분석

### 제 1 절 DMPO-OH radical의 특성 분석

이번 절에서는 DMPO-OH radical의 반감기와 기본적인 특성 등이 실제 실험에서도 동일하게 적용되는지를 확인한 실험의 결과와 그에 대한 분석을 기록하였다. 실험을 통해 얻은 데이터는 Microsoft Office Excel 과 Origin Pro 8로 분석하였고, 그 값은 제 3장 대상 및 방법 제 2절에서 언급한 반감기 함수  $y = A_0 e^{-\lambda t}$ 에 대입하여 분석 시간에 따른 이론적 초기 값 획득에 사용되었다.

아래의 표와 그림은 이러한 방법으로 정리된 실험 결과를 기록한 것으로, 먼저 그림 4-1은 분석 시간 경과에 따른 DMPO-OH radical intensity의 감소 경향을 나타낸 그래프이다. 수용액의 분석은 X-ray 조사가 완료되고 6분, 9분 12분이 지난 뒤에 시작하였으며, 그림 4-1은 그에 따라 X-ray 조사 후 6분, 9분, 12분에서의 DMPO-OH radical intensity를 나타내고 있다. 추가적으로 그래프에 나타난 0분에서의 DMPO-OH radical intensity는 반감기를 870초로 두고 역산한 값으로 실제 실험값이 아닌 이론값이다.

이 값을 바탕으로 해당 그래프를 분석하면 DMPO-OH radical signal의 두 번째와 세 번째 peak값의 합을 기준으로 한 분석은  $y = 2295.13 \exp(-x/12.53) + 1228.97$ 라는 결과 식을 도출하였고, 전체 peak값의 합을 기준으로 한 분석은  $y = 2206.53 \exp(-x/16.92) + 545.65$ 라는 결과 식을 도출하였다. 여기에서 각각의 식은 반감기로 12.53분과 19.92분을 가졌는데, 이것을 실제 반감기인 870초(14.5분)와 비교한다면 두 번째

와 세 번째 peak값의 합을 기준으로 한 식이 상대적으로 적은 오차를 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

다음은 동일 실험에 대한 6분, 9분, 12분에서의 DMPO-OH radical intensity를 역산하여 방사선 조사 직후의 추정 intensity를 정리한 표 4-1의 분석이다. 이 표를 보면 각각의 실험 차수에 대한 변동 계수를 알 수 있었는데, 이렇게 계산된 변동 계수는 한 실험에 대해서는 분석 시간에 관계없이 유사한 수치의  $A_0$  값을 구할 수 있음을 암시하고 있다.

비슷한 방법으로 같은 시간대에 대한 다양한 DMPO-OH radical intensity를 역산하여 방사선 조사 직후의 추정 intensity를 정리한 표 4-2는 표 4-1에 비해 더 큰 변동 계수를 가졌지만 그럼에도 불구하고 앞서서와 마찬가지로 동일한 시간대에 다른 실험 차수에서도 유사한 수치의  $A_0$  값을 구할 수 있음을 암시하고 있다.

표 4-2의 위와 같은 실험 결과는 그림 4-2를 통해 더욱 명확하게 알 수 있는데, 그래프를 보면 시간 경과에 따라 조금씩 상승하는 경향을 보이는 것은 하지만 그 수치가 각각의 오차 범위 안에 있음을 확인할 수 있다.

그림 4-1과 그림 4-2를 비교하면 그림 4-1에서는 두 번째와 세 번째 peak값의 합을 기준으로 한 식이 이론값에는 더 가까이 있다는 것을 알 수 있었고, 그림 4-2에서는 전체 peak값의 합을 기준으로 하였을 때 실험적으로 더욱 안정적인, 곧 재현성이 높은 결과가 얻어진다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 시간에 대한 감소 정도가 상대적으로 둔감한 첫 번째와 두 번째 peak의 영향에 의한 것으로 볼 수 있는데, 동일한 시간이 지나도 해당 peak의 값이 두 번째와 세 번째 peak의 값보다 작은 비율로 감소하여 이론적인 반감기와는 어느 정도의 차이를 보이지만 실험의 재현성에서는 더욱 안정적인 결과를 나타낸 것이다.



표 4-1. X-ray 50Gy를 조사했을 때의 각 실험 별 DMPO-OH signal intensity 초기 값 계산 결과

	1차 실험		2차 실험		3차 실험	
분석 시간	2 <sup>nd</sup> , 3 <sup>rd</sup> Peak	Total Peak	2 <sup>nd</sup> , 3 <sup>rd</sup> Peak	Total Peak	2 <sup>nd</sup> , 3 <sup>rd</sup> Peak	Total Peak
6 Min' Ao	3432.577	2695.695	3600.612	2849.165	3339.8	2633.168
9 Min' Ao	3391.735	2678.681	3645.279	2836.064	3528.824	2748.53
12 Min' Ao	3542.063	2715.031	3685.567	2857.57	3557.545	2757.209
평균값	3455.458	2696.469	3643.819	2847.600	3475.39	2712.969
표준편차	63.468	14.850	34.698	8.849	96.591	56.539
변동계수	0.018	0.006	0.010	0.003	0.028	0.021

표 4-2. X-ray 50Gy를 조사했을 때의 시간에 따른 DMPO-OH signal intensity 초기 값 계산 결과

2 <sup>nd</sup> , 3 <sup>rd</sup> Peak Value						
분석 시간	Tr. 1	Tr. 2	Tr.3	평균	표준편차	변동계수
6 Min' Ao	3432.577	3600.612	3339.800	3457.663	107.944	0.031
9 Min' Ao	3391.735	3645.279	3528.824	3521.946	103.623	0.029
12 Min' Ao	3542.063	3685.567	3557.545	3595.058	64.311	0.018
Total Peak Value						
분석 시간	Tr. 1	Tr. 2	Tr.3	평균	표준편차	변동계수
6 Min' Ao	2695.695	2849.165	2633.168	2726.009	90.748	0.033
9 Min' Ao	2678.681	2836.064	2748.530	2754.425	64.386	0.023
12 Min' Ao	2715.031	2857.570	2757.209	2776.603	59.785	0.022

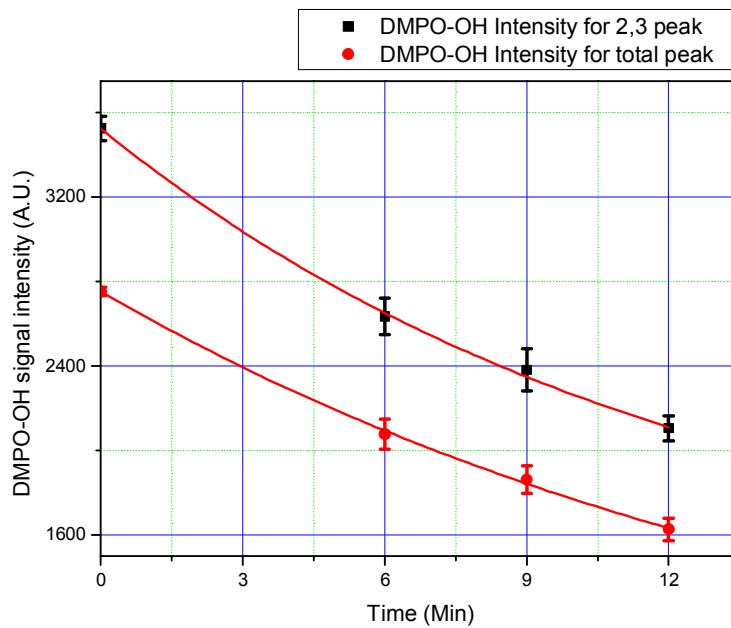


그림 4-1. 시간 경과에 따른 DMPO-OH signal intensity 변화 그래프.

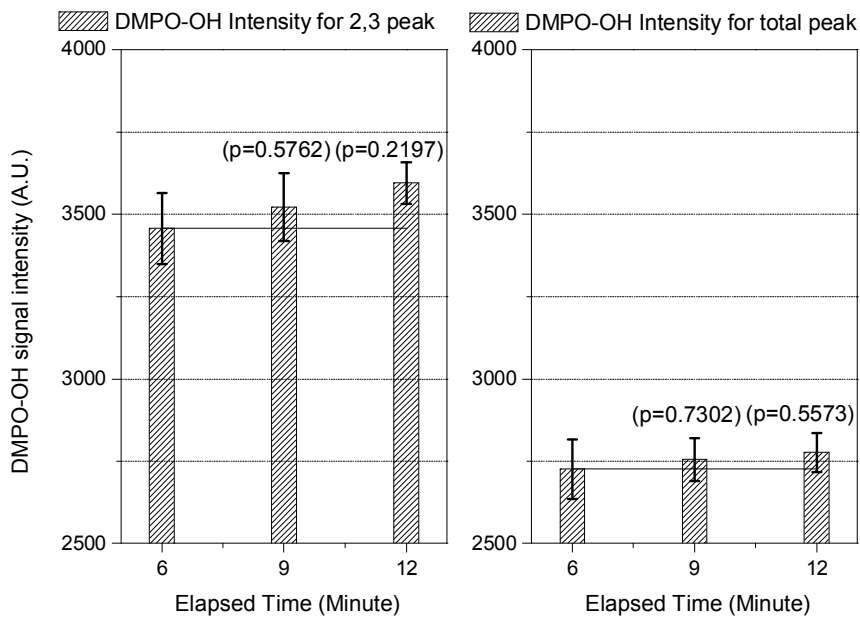


그림 4-2. 시간 경과에 따른 DMPO-OH signal intensity 초기 값 비교.

## 제 2 절 X-ray 조사에 따른 DMPO-OH radical 생성량 분석

이번 절에서는 X-ray 조사선량에 따른 DMPO-OH radical의 생성량을 정량적으로 분석하기 위한 실험의 결과와 그에 대한 분석을 기록하였다. 실험을 통해 얻은 데이터는 Microsoft Office Excel과 Origin Pro 8로 분석하였고, 그 값은 제 3장 대상 및 방법 제 2절에서 언급한 반감기 함수  $y = A_0 e^{-\lambda t}$ 에 대입하여 분석 시간에 따른 이론적 초기 값 획득에 사용되었다.

아래의 표와 그림은 이러한 방법으로 정리된 실험 결과를 기록한 것으로, 먼저 표 4-3은 다섯 번의 실험에 대한 X-ray 조사선량에 따른 DMPO-OH radical의 초기 값을 계산한 결과이다. 표 4-3에서 각각의 조사선량에 따른 변동계수를 보자면 DMPO-OH radical signal의 두 번째와 세 번째 peak값의 합을 기준으로 한 값과 전체 peak값의 합을 기준으로 한 값 사이에 큰 차이가 없다는 것을 알 수 있었으며, 두 데이터 모두 공통적으로 정확한 수치의 측정값을 제공하기 보다는 수치의 범위를 대략적인 수준에서 정량적으로 제공하고 있음을 알 수 있었다.

또한 그림 4-3은 표 4-3의 결과를 일차함수로 나타낸 그래프인데, 그래프를 그린 Origin Pro 8에 따르면 두 번째와 세 번째 peak값의 합을 기준으로 한 식의 추세선은  $y = 69.683x + 252.881$  ( $r^2=0.98$ ) 이고 전체 peak값의 합을 기준으로 한 식의 추세선은  $y = 53.717x + 224.022$  ( $r^2=0.98$ )임을 알 수 있었다. 추세선의 R-square 값에 따르면 두 그래프 모두 강한 직선성(linearity)을 갖고 있음을 알 수 있으며, 이는 곧 X-ray 조사선량이 증가함에 따라 생성되는 DMPO-OH radical의 양 또한 비례하여

증가함을 의미하는 근거가 된다.

표 4-3. X-ray 조사선량에 따른 DMPO-OH radical의 초기 값 계산 결과

A0 추정비교	평균 2 <sup>nd</sup> 3 <sup>rd</sup> Peak Value	표준편차	변동계수	평균 Total Peak Value	표준편차	변동계수
2 Gy	363.108	16.861	0.046	305.461	14.053	0.046
5 Gy	637.02	22.244	0.035	529.755	19.513	0.037
10 Gy	1052.362	66.795	0.063	845.903	52.276	0.062
20 Gy	1790.16	58.728	0.033	1409.867	51.882	0.037
35 Gy	2471.785	81.336	0.033	1945	65.52	0.034
50 Gy	3629.59	313.031	0.086	2842.917	225.147	0.080

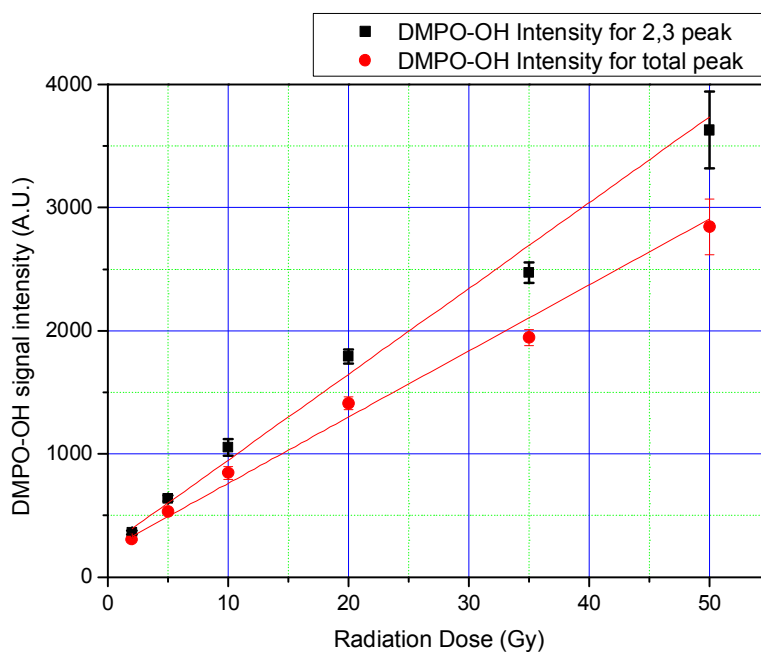


그림 4-3. X-ray 조사선량 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 intensity 값 변화

### 제 3 절 플라즈마 처리에 따른 DMPO-OH radical 생성량 분석

이번 절에서는 플라즈마 처리에 따른 DMPO-OH radical의 생성량을 정량적으로 분석하기 위한 실험의 결과와 그에 대한 분석을 기록하였다. 실험에 사용된 분사형 대기압 플라즈마(APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet) 발생 장치는 운전 조건으로 15 kHz의 고정된 RF frequency 값을 갖고, 플라즈마 처리 시간과 헬륨 가스 유속, 플라즈마 발생 전압 등이 실험에 맞추어 변화였다. 실험을 통해 얻은 데이터는 Microsoft Office Excel과 Origin Pro 8로 분석하였고, 그 값은 제 3장 대상 및 방법 제 2절에서 언급한 반감기 함수  $y = A_0 e^{-\lambda t}$ 에 대입하여 분석 시간에 따른 이론적 초기 값 획득에 사용되었다.

#### 1. 플라즈마 처리 시간에 따른 DMPO-OH radical 생성량 변화 관찰

이번 항목에서는 플라즈마 처리 시간에 따른 DMPO-OH radical의 생성량을 정량적으로 분석하기 위한 실험의 결과와 그에 대한 분석을 기록하였다. 실험에 사용된 분사형 대기압 플라즈마(APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet) 발생 장치의 운전 조건은 RF frequency 15 kHz, 플라즈마 발생 전압 5.5 Vp, 헬륨 가스 유속 1 LPM (liter per minute) 이 설정되었다. 플라즈마 처리 시간은 각각 1, 2, 3, 4, 5분이며, 다음의 표와 그림은 앞의 실험 방법에 따라 진행된 실험 결과를 정리한 것이다.

먼저 표 4-4는 플라즈마 처리 시간에 따른 DMPO-OH radical의 초기

값을 계산한 결과이다. 실험은 동일 조건에 대해 세 번에서 다섯 번 반복되었고, 표 4-4에서 그에 따른 변동 계수를 보면 DMPO-OH radical signal의 두 번째와 세 번째 peak값의 합을 기준으로 한 값과 전체 peak값의 합을 기준으로 한 값 사이에 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 그리고 두 데이터 모두 공통적으로 정확한 수치의 측정값을 제공하기 보다는 수치의 범위를 대략적인 수준에서 정량적으로 제공하고 있음을 알 수 있었다.

또한 그림 4-4는 표 4-4의 결과를 일차함수로 나타낸 그래프인데, 그래프를 그린 Origin Pro 8에 따르면 두 번째와 세 번째 peak값의 합을 기준으로 한 데이터의 추세선은  $y = 4167.421x + 593.395$  ( $r^2=0.97$ ) 이고 전체 peak값의 합을 기준으로 한 데이터의 추세선은  $y = 3115.905x + 516.988$  ( $r^2=0.97$ ) 임을 알 수 있었다. 각각의 추세선의 R-square 값을 보면 두 그래프 모두 강한 직선성(linearity)을 갖고 있음을 알 수 있으며, 이는 곧 플라즈마 처리 시간이 증가함에 따라 생성되는 DMPO-OH radical의 양 또한 비례하여 증가함을 의미하는 근거가 된다.

표 4-4. 플라즈마 처리 시간에 따른 DMPO-OH radical의 초기 값 계산 결과

A0 추정비교	평균 2 <sup>nd</sup> 3 <sup>rd</sup> Peak Value	표준편차	변동계수	평균 Total Peak Value	표준편차	변동계수
1 min	6292.632	942.180	0.150	4711.763	698.399	0.148
2 min	9214.012	792.139	0.086	6979.035	574.078	0.082
3 min	12971.809	156.277	0.012	9749.229	130.762	0.013
4 min	18147.690	687.123	0.038	13609.380	495.251	0.036
5 min	22014.220	757.786	0.034	16566.580	606.141	0.037

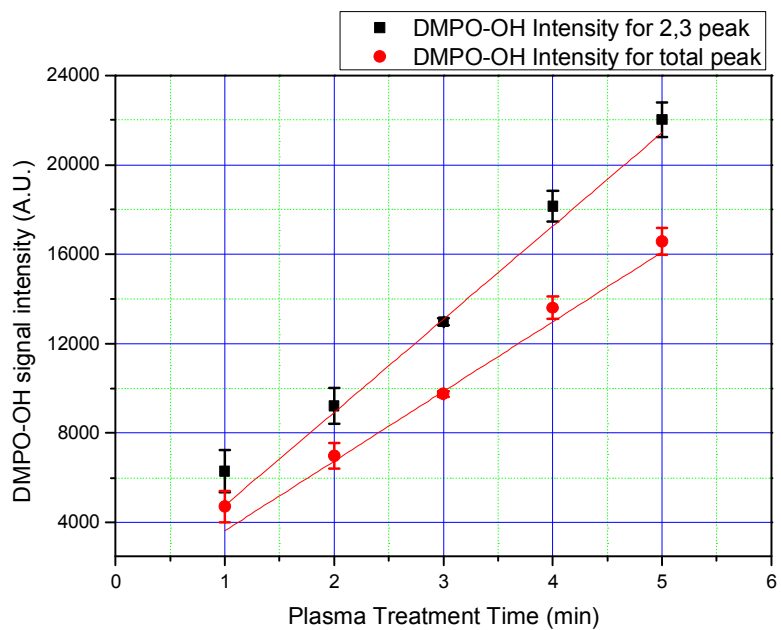


그림 4-4. 플라즈마 처리 시간 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 intensity 값 변화



## 2. 헬륨 가스 유속에 따른 DMPO-OH radical 생성량 변화 관찰

이번 항목에서는 헬륨 가스 유속 변화에 따른 DMPO-OH radical의 생성량을 정량적으로 분석하기 위한 실험의 결과와 그에 대한 분석을 기록하였다. 실험에 사용된 분사형 대기압 플라즈마(APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet) 발생 장치의 운전 조건은 RF frequency 15 kHz, 플라즈마 발생 전압 5.5 Vp, 플라즈마 조사 시간 2분이 설정되었다. 헬륨 가스 유속은 각각 1, 1.5, 2 LPM (liter per minute)이며, 다음의 표와 그림은 앞의 실험 방법에 따라 진행된 실험 결과를 정리한 것이다.

먼저 표 4-5는 세 번에서 네 번에 걸친 헬륨 가스 유속 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 값을 계산한 실험 결과이다. 표 4-5에서 헬륨 가스 유량 변화에 따른 변동계수를 보면 DMPO-OH radical signal의 두 번째와 세 번째 peak값의 합을 기준으로 한 값과 전체 peak값의 합을 기준으로 한 값 사이에 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 그리고 두 데이터 모두 공통적으로 정확한 수치의 측정값을 제공하기 보다는 수치의 범위를 대략적인 수준에서 정량적으로 제공하고 있음을 알 수 있었다.

또한 그림 4-5는 표 4-5의 결과를 일차함수로 나타낸 그래프인데, 그래프를 그린 Origin Pro 8에 따르면 두 번째와 세 번째 peak값의 합을 기준으로 한 데이터의 추세선은  $y = 4755.653x + 2568.927$  ( $r^2=0.33$ ) 이고 전체 peak값의 합을 기준으로 한 데이터의 추세선은  $y = 3511.891x + 2085.948$  ( $r^2=0.33$ ) 임을 알 수 있었다. 각각의 추세선의 R-square 값을 보면 두 그래프 모두 직선성(linearity)이 낮다는 것을 알 수 있는데, 이는 곧 헬륨 가스의 유속이 DMPO-OH radical 형성에 큰 기여를 하지 않는다는 방증이기도 하다.

추가로 그림 4-5의 값을 보면 헬륨 가스의 유속이 1 LPM이었을 때와 1.5 LPM 사이에 큰 변화는 없지만 2 LPM으로 변할 때에는 DMPO-OH radical 생성에 급격한 변화가 있음을 알 수 있는데, 이와 같은 실험 결과는 DMPO 용액과 플라즈마의 반응 단면적이 2 LPM일 때에 상대적으로 더 넓었다는 것을 통해 이해할 수 있다. DMPO-OH radical의 생성에 헬륨 가스의 유속보다 플라즈마 반응 단면적이 더 큰 영향을 줘서 반응 단면적이 급격하게 변화하는 2 LPM에서 많은 양의 radical 이 생성된 것이다.

표 4-5. 플라즈마 발생 헬륨 가스 유량 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 값 계산 결과

A0 추정비교	평균 2 <sup>nd</sup> 3 <sup>rd</sup> Peak Value	표준편차	변동계수	평균 Total Peak Value	표준편차	변동계수
1 LPM	9214.012	792.139	0.086	6979.035	574.078	0.082
1.5 LPM	8630.443	421.902	0.049	6493.877	320.297	0.049
2 LPM	12828.303	498.432	0.039	9640.794	355.973	0.037

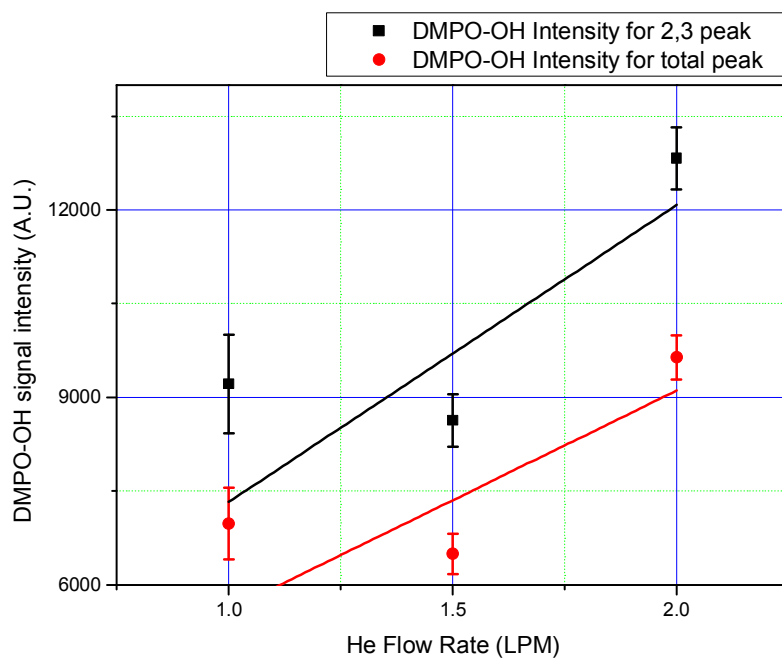


그림 4-5. 플라즈마 발생 헬륨 가스 유량 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 intensity 변화

### 3. 플라즈마 발생 전압에 따른 DMPO-OH radical 생성량 변화 관찰

이번 항목에서는 플라즈마 발생 전압 변화에 따른 DMPO-OH radical의 생성량을 정량적으로 분석하기 위한 실험의 결과와 그에 대한 분석을 기록하였다. 실험에 사용된 분사형 대기압 플라즈마(APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet) 발생 장치의 운전 조건은 RF frequency 15 kHz, 플라즈마 조사 시간 2분, 헬륨 가스 유속 1 LPM (liter per minute)이 설정되었다. 플라즈마 발생 전압은 각각 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 Vp이며, 다음의 표와 그림은 앞의 실험 방법에 따라 진행된 실험 결과를 정리한 것이다.

먼저 표 4-6은 세 번에서 다섯 번의 실험에 걸친 플라즈마 발생 전압 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 값을 계산한 결과이다. 표 4-6에서 발생 전압에 따른 변동계수를 보면 DMPO-OH radical signal의 두 번째와 세 번째 peak값의 합을 기준으로 한 값과 전체 peak값의 합을 기준으로 한 값 사이에 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 그리고 두 데이터 모두 공통적으로 정확한 수치의 측정값을 제공하기 보다는 수치의 범위를 대략적인 수준에서 정량적으로 제공하고 있음을 알 수 있었다.

또한 그림 4-6는 표 4-6의 결과를 일차함수로 나타낸 그래프인데, 그래프를 그린 Origin Pro 8에 따르면 두 번째와 세 번째 peak값의 합을 기준으로 한 데이터의 추세선은  $y = 2118.928x - 3082.599$  ( $r^2=0.98$ ) 이고 전체 peak값의 합을 기준으로 한 데이터의 추세선은  $y = 1581.918x - 2235.182$  ( $r^2=0.98$ ) 임을 알 수 있었다. 각각의 추세선의 R-square 값을 보면 두 그래프 모두 강한 직선성(linearity)을 갖고 있음을 알 수 있으며, 이는 곧 플라즈마 발생 전압이 높아짐에 따라 생성되는 DMPO-OH radical의 양 또한 비례하여 증가한다는 근거가 된다.

표 4-6. 플라즈마 발생 전압 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 값 계산 결과

A0 추정비교	평균 2 <sup>nd</sup> 3 <sup>rd</sup> Peak Value	표준편차	변동계수	평균 Total Peak Value	표준편차	변동계수
2.5 Vp	2208.813	159.771	0.072	1714.848	128.160	0.075
3.5 Vp	4528.907	362.401	0.080	3425.623	240.880	0.070
4.5 Vp	6108.184	388.712	0.064	4591.390	292.772	0.064
5.5 Vp	9214.012	792.139	0.086	6979.035	574.078	0.082

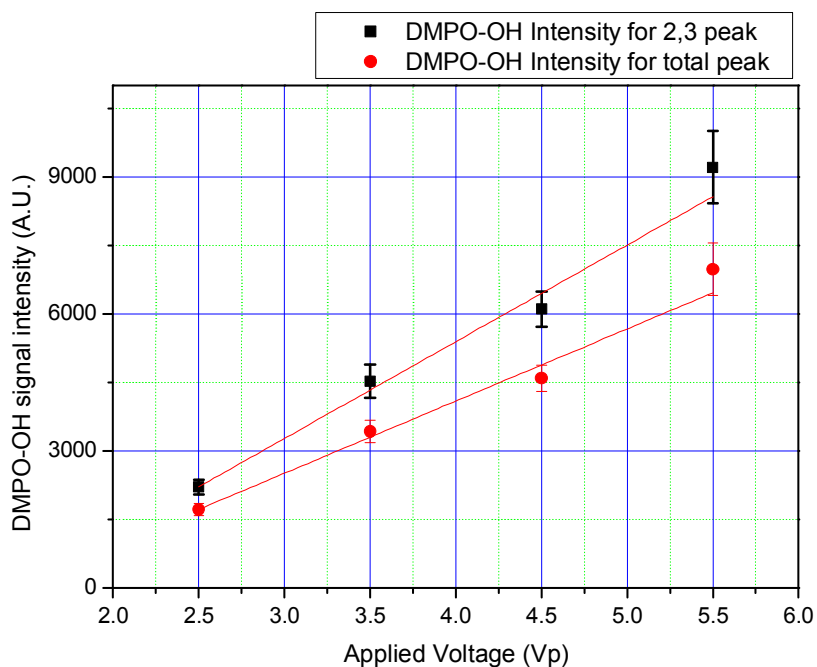


그림 4-6. 플라즈마 발생 전압 변화에 따른 DMPO-OH radical의 초기 intensity 변화

## 제 4 절 X-ray와 플라즈마의 클론형성능 제거 효과 비교

이번 절에서는 쥐의 혈관내피세포(mouse endothelial cells, MECs)에 X-ray와 플라즈마를 직접 조사하여 각각의 클론형성능 제거(clonogenic cell killing) 효과를 비교하는 실험의 결과와 그에 대한 분석을 기록하였다. 실험에 사용된 방사선 조사 장치는 450 kVp, 10 mA의 가동 조건에서 방사선 조사 시간을 바꾸어 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, 10 Gy의 X-ray를 생성하였고, 플라즈마 처리 장치는 RF frequency 15 kHz, 헬륨 가스 유속 1 LPM (liter per minute), 플라즈마 발생 전압 2.5 Vp의 운전 조건에서 1분, 2분, 3분 동안 플라즈마를 생성하였다.

각각의 조사 장치를 위의 조건에 맞춘 이유는 플라즈마 처리 장치의 운전 조건을 RF frequency 15 kHz, 헬륨 가스 유속 1 LPM, 플라즈마 발생 전압 2.5 Vp으로 두고 2분 동안 조사했을 때 생성된 DMPO-OH radical의 양이 27 Gy의 X-ray를 조사하였을 때 생성된 DMPO-OH radical의 양과 유사하다는 분석을 할 수 있었기 때문이다.

다음의 표와 그림은 위의 순서에 따라 진행된 실험 결과를 정리한 것으로, 표 4-7과 표 4-8은 각각 방사선 조사에 따른 MECs의 생존율(survival fraction)과 플라즈마 처리에 따른 MECs의 생존율을 나타내고 있다. 이것을 같은 평면 위에 로그 스케일로 나타내면 그림 4-7과 같은 그래프를 얻을 수 있는데, 그래프를 보면 플라즈마 처리 장치의 운전 조건을 RF frequency 15 kHz, 플라즈마 발생 전압 2.5 Vp, 헬륨 가스 유속 1 LPM으로 두고 2분 동안 조사했을 때의 클론형성능 제거 효과와 5.5 Gy X-ray의 클론형성능 제거 효과가 서로 유사한 범위에 있음을 알

수 있다.

DMPO-OH radical의 intensity를 기준으로 해당 조건에서 플라즈마에 기대했던 효과가 27 Gy 수준이었다는 점을 고려했을 때, 위의 수치는 예상했던 것보다 1/5 정도 적은 값이었다. DMPO-OH radical의 형성량과 MECs에 대한 클론형성능 제거 효과 사이에 이러한 차이가 나타나는 까닭으로는 세포의 클론형성능 제거를 결정하는 요소로 수산화기 외에 다른 인자가 존재하고 있기 때문이라고 볼 수 있다.

표 4-7. 방사선 조사에 따른 MECs의 생존율

방사선 조사량 (Gy)	0	2	4	6	8
Survival Fraction of MECs	1	0.751	0.239	0.053	0.019

표 4-8. 플라즈마 처리에 따른 MECs의 생존율

플라즈마 처리 시간 (Min)	1	2	3
Survival Fraction of MECs	0.1773	0.0756	0.0577

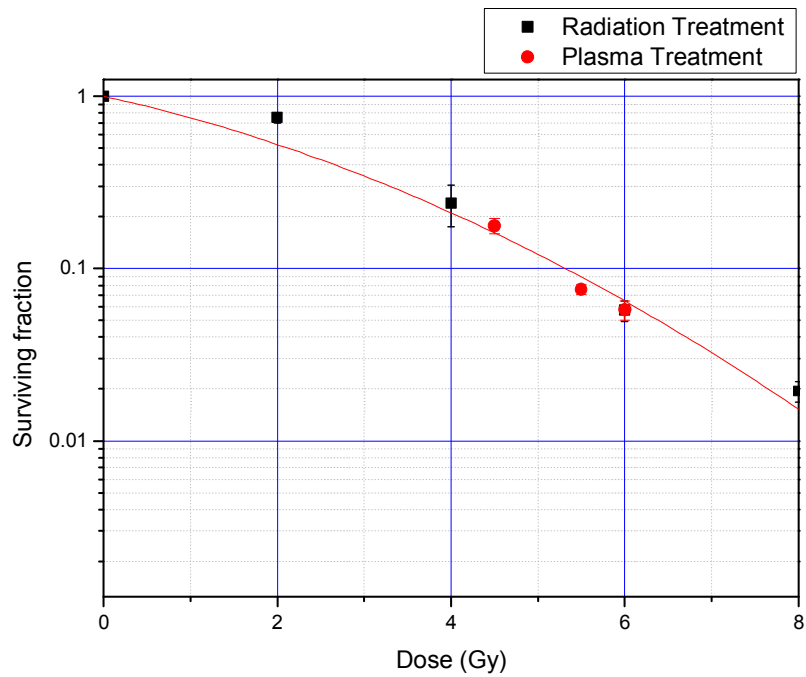


그림 4-7. 방사선 및 플라즈마 조사 변화에 따른 MECs에 대한 클론형성능 제거 효과 변화 그래프.



## 제 5 장 결론

본 연구에서는 분사형 대기압 플라즈마(APPJ; Atmospheric Pressure Plasma Jet)의 방사선, 그 중에서도 특히 X-ray와의 동등성을 평가하기 위하여 X-ray 조사에 따른 수산화기 생성량과 APPJ 플라즈마 처리에 따른 수산화기 생성량의 정량적 비교를 시도하였다. 수산화기의 정량적 분석에는 수산화기의 생존 시간을 길게 하는 시약인 DMPO를 사용하였고, 실험을 통해 생성되는 DMPO-OH radical의 분석은 서울대학교 농생명과학 공동기기원(NICEM)의 핵자기공명분광기실에 속한 전자스핀공명분광기(Electron Spin Resonance (ESR) spectrometer; JES-TE200, JEOL, Tokyo, 1999)를 사용하였다.

먼저 방사선 조사를 통한 DMPO-OH radical의 특성 연구와 생성량 관찰 실험에서는 기존에 알려진 DMPO-OH radical의 반감기 870초가 어느 정도 신뢰할 수 있는 값이라는 것을 확인할 수 있었고, DMPO-OH radical intensity 분석에서 signal의 두 번째와 세 번째 peak값의 합을 기준으로 한 분석은 이론적인 오차를 줄이는 반면 전체 peak값의 합을 기준으로 한 분석은 실험의 재현성을 높인다는 것을 알 수 있었다. 또한 X-ray 조사량을 2 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 20 Gy, 35 Gy, 50 Gy로 하여 방사선 조사량의 증가에 따른 DMPO-OH radical의 생성을 변화를 보았을 때 분석 그래프의 R-square 값이 0.98로 강한 직선성(linearity)을 갖고 있음을 알 수 있었다.

다음으로 플라즈마 처리에 따른 DMPO-OH radical의 생성량 관찰 실험에서는 플라즈마 세기를 결정하는 세 개의 인자인 플라즈마 처리 시간, 헬륨 가스 유속, 플라즈마 발생 전압의 변화에 따른 DMPO-OH

radical의 생성량 변화를 관찰할 수 있었다. 먼저 플라즈마 처리 시간에 따른 DMPO-OH radical의 생성량 변화를 보면 플라즈마 조사 시간에 따라 DMPO-OH radical의 생성량 또한 비례( $r^2=0.97$ )하여 증가함이 나타났다. 또한 플라즈마 생성에 필요한 헬륨 가스의 유속 변화 실험에서는 헬륨 가스 유속의 변화보다 그로 인한 반응 단면적의 변화가 DMPO-OH radical 생성에 더 큰 영향을 주고 있음을 알 수 있었다. 그리고 플라즈마 발생 전압 변화에 따른 DMPO-OH radical의 생성량 변화에서도 플라즈마 발생 전압이 높아지면 그에 딸 DMPO-OH radical의 생성량 또한 비례( $r^2=0.98$ )하여 증가한다는 것을 알 수 있었다.

그리고 위의 과정을 통해 얻은 각각의 추세선을 바탕으로 APPJ 플라즈마 발생 장치의 운전 조건이 RF frequency 15 kHz, 헬륨 가스 유속 1 LPM (liter per minute), 플라즈마 발생 전압 2.5 Vp, 플라즈마 조사 시간 2분이었을 때 27 Gy의 X-ray와 유사한 양의 DMPO-OH radical을 생성한다는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서는 이와 같은 APPJ의 X-ray 동등성이 실제 세포 실험에서도 일치하는지 확인하고자 클론형성능 제거(clonogenic cell killing) 효과 비교 실험을 진행하였고, 실험 대상으로는 쥐의 혈관내피세포(mouse endothelial cells, MECs)가 사용되었다. 해당 실험에서 X-ray는 450 kVp, 10 mA의 가동 조건에서 방사선 조사 시간을 바꾸어 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, 10 Gy 만큼의 조사가 이루어졌고, APPJ 플라즈마는 운전 조건으로 RF frequency 15 kHz, 헬륨 가스 유속 1 LPM, 플라즈마 발생 전압 2.5 Vp를 설정하면서 세포에 1분, 2분, 3분 동안 처리되었다.

그리고 그 결과 MECs에 대한 각 조사 장치의 클론형성능 제거 효과는 애초에 예상했던 것과는 다른 경향을 보였다. APPJ 플라즈마는 RF frequency 15 kHz, 헬륨 가스 유속 1 LPM, 플라즈마 발생 전압 2.5 Vp,

플라즈마 조사시간 2분의 운전 조건에서 5.5 Gy X-ray와 유사한 범위의 클론형성능 제거 효과를 보인 것이다. 이러한 현상이 발생한 이유로는 세포의 클론형성능 제거를 유발하는 요인으로 수산화기 외에 다른 인자가 있을 것이라는 가능성에 있다.

## 참 고 문 헌

- [1] Gregory Fridman, Gary Friedman, Alexander Gutsol, Anatoly B. Shekhter, Victor N. Vasilets, Alexander Fridman, “Applied Plasma Medicine”, Plasma Processes and Polymers, 5, 503-533, 2008.
- [2] Julia Heinlin, Gregor Morfill, Michael Landthaler, Wilhelm Stolz, Georg Isbary, Julia L. Zimmermann, Tetsuji Shimizu, Sigrid Karrer, "Plasma medicine: possible applications in dermatology", Journal of the German Society of Dermatology, 2010.
- [3] Hyun Woo Lee, Gon Jun Kim, Jae Moon Kim, Jeong Kil Park, Jae Koo Lee, and Gyoo Cheon Kim, “Tooth Bleaching with Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma”, Journal of Endodontics, Vol. 35, No. 4, 587-592, 2009.
- [4] Vijay Singh, Chandur Piryani, Katherine Liao, and Sarah Nieschulz, “Percutaneous Disc Decompression Using Coblation (Nucleoplasty™) in the Treatment of Chronic Discogenic Pain”, Pain Physician, Vol. 5, No. 3, 250-259, 2002.
- [5] 이승준, 오성훈, 이규석, 이형중, 백광흠, 김재민, “요추간판탈출증 환자에서 수핵성형술에 의한 추간판내치료”, 대한신경외과학회지, 제33권, 388-392, 2003.
- [6] Sang Chul Lee, “Percutaneous intradiscal treatments for discogenic pain”, Acta Anaesthesiologica Taiwanica, Vol. 50, Issue 1, 25-28, 2012.

- [7] B.A. Georgy, W. Wong, "Plasma-Mediated Radiofrequency Ablation Assisted Percutaneous Cement Injection for Treating Advanced Malignant Vertebral Compression Fractures", American Journal of Neuroradiology, 28, 700-705, 2007.
- [8] Chul-Ho Kim, "New Converging Technology; Plasma Medicine", Korean Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, 53, 593-602, 2010
- [9] H. Schöllnberger, R.E.J. Mitchel, E.I. Azzam, D.J. Crawford-Brown and W. Hofmann, "Explanation of protective effects of low doses of gamma-radiation with a mechanistic radiobiological model", International Journal of Radiation Biology, Vol.78, No.12, 1159-1173, 2002.
- [10] J.F. Ward, J.W. Evans, C.L. Limoli, and P.M. Calabro-Jones, "Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA", British Journal of Cancer, 55, Suppl. VIII, 105-112, 1987.
- [11] 박희곤, 송재홍, "방사, 방사선 화학", 청구문화사, 1998.
- [12] Edward L. Alpen, "Radiation Biophysics", Prentice-Hall, 1990.
- [13] Francis F. Chen, "Introduction to Plasma Physics and Controlled Fusion", Plenum Publishing Corporation, 1984
- [14] G.S. Selwyn, H.W. Herrmann, J. Park, and I. Henins, "Materials Processing Using an Atmospheric Pressure, RF-Generated Plasma Source", Contributions to Plasma Physics, Vol.6, 610-619, 2001.

- [15] Thomas von Woedtke, Klaus-Dieter Weltmann, "Plasma medicine", 3<sup>rd</sup> European summer school of plasma physics in science and technology, 2009.
- [16] Frederick S. Archibald and Irwin Fridovich, "Oxygen radicals, oxygen toxicity and the life of microorganisms", *Acta Médica Portuguesa*, 4, 101-112, 1983.
- [17] Norman I. Krinsky, "Mechanisms of Inactivation of Oxygen Species by Carotenoids", *Anticarcinogenesis and Radiation Protection*, 41-46, 1988.
- [18] Haiyan Wu, Peng Sun, Hongqing Feng, Haixia Zhou, Ruexue Wang, Yongdong Liang, Jingfen Lu, Weidong Zhu, Jue Zhang, Jing Fang, "Reactive Oxygen Species in a Non-thermal Plasma Microjet and Water System: Generation, Conversion, and Contributions to Bacteria Inactivation - An Analysis by Electron Spin Resonance Spectroscopy", *Plasma Processes and Polymers*, 2012.
- [19] G Y Park, S J Park, M Y Choi, I G Koo, J H Byun, J W Hong, J Y Sim, G J Collins and J K Lee, "Atmospheric-pressure plasma sources for biomedical applications", *Plasma Sources Science and Technology*, 21, 2012.
- [20] Na Bai, Peng Sun, Haixia Zhou, Haiyan Wu, Ruixue Wang, Fuxiang Liu, Weidong Zhu, Jose L. Lopez, Jue Zhang, Jing Fang, "Inactivation of *Staphylococcus aureus* in Water by a Cold, He/O<sub>2</sub>

- Atmospheric Pressure Plasma Microjet", *Plasma Processes and Polymers*, 8, 424-431, 2011.
- [21] G. M. Makrigiorgos, M. Folkard, C. Huang, E. Bump, J. Baranowska-Kortylewicz, S. K. Sahu, B. D. Michael and A. I. Kassis, "Quantification of Radiation-Induced Hydroxyl Radicals within Nucleohistones Using a Molecular Fluorescent Probe", *Radiation Research*, Vol.138, 177-185, 1994
- [22] Takuya Maeyama, Shinichi Yamashita, Yusa Muroya, Yosuke Katsumura, "Application of fluorescent probe to yield determination of OH radical produced in water radiolysis with heavy ions of energies up to 28 GEV", *Joint International Workshop: Nuclear Technology and Society - Needs for Next Generation*, 2008.
- [23] Takuya Maeyama, Shinichi Yamashita, Gérard Baldacchino, Mitsumasa Taguchi, Atsushi Kimura, Takeshi Murakami, Yosuke Katsumura, "Production of a fluorescence probe in ion-beam radiolysis of aqueous coumarin-3-carboxylic acid solution-1: Beam quality and concentration dependences", *Radiation Physics and Chemistry*, 80, 535-539, 2011.
- [24] G. Baldacchino, T. Maeyama, S. Yamashita, M. Taguchi, A. Kimura, Y. Katsumura, T. Murakami, "Determination of the time-dependent OH-yield by using a fluorescent probe. Application to heavy ion irradiation", *Chemical Physics Letters*, 468, 275-279, 2009.

- [25] Guillaume Loutit, Sarah Foley, Julie Cabillic, Hervé Coffigny, Frédéric Taran, Alain Valleix, Jean Philippe Renault, Serge Pin, "The reaction of coumarin with the OHradical revisited: hydroxylation product analysis determined by fluorescence and chromatography", *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 72, 119-124, 2005.
- [26] Arnit Kumar Jana and S.N. Chatterjee, "Estimation of hydroxyl free radicals produced by ultrasound in Fricke solution used as a chemical dosimeter", *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 2, No. 2, 1995.
- [27] Ting-Nien Wu, and Meng-Chun Shi, "pH-affecting sonochemical formation of hydroxyl radicals under 20 kHz ultrasonic radiation", *Sustainable Environment Research*, 20(4), 245-250, 2010.
- [28] Damien M. Murphy, "Metal Oxide Catalysis - EPR (Electron Paramagnetic Resonance) Spectroscopy of Polycrystalline Oxide Systems", WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009.
- [29] Kazunori Anzai, Tetsuya Aikawa, Yoshiko Furukawa, Yoshikazu Matsushima, Shiro Urano, and Toshihiko Ozawa, "ESR measurement of rapid penetration of DMPO and DEPMPO spin traps through lipid bilayer membranes", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 415, 251-256, 2003.
- [30] Keith P. Madden and Hitoshi Taniguchi, "The role of the DMPO - Hydrated electron spin adduct in DMPO- $\cdot$ OH spin trapping", *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 30, No. 12, 1374-1380,



2001.

- [31] Goran Bácić, Ivan Spasojević, Bojana Šćecrov, Milós Mojovic, "Spin trapping of oxygen free radicals in chemical and biological systems: New traps, radicals and possibilities", *Spectrochimica Acta, Part A* 69, 1354–1366, 2008.
- [32] Linxiang Li, Yoshihiro Abe, Kiyotada Kanagawa, Noriko Usui, Kazuhiro Imai, Tadahiko Mashino, Masataka Mochizuki, Naoki Miyata, "Distinguishing the 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO)-OH radical quenching effect from the hydroxyl radical scavenging effect in the ESR spin-trapping method", *Analytica Chimica Acta*, 512, 121–124, 2004.
- [33] T. Uchinoa, H. Tokunaga, M. Ando, H. Utsumi, "Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO<sub>2</sub> - UVA treatment", *Toxicology in Vitro*, 16, 629 - 635, 2002.
- [34] Satoshi Horikoshi, Hisao Hidaka, Nick Serpone, "Hydroxyl radicals in microwave photocatalysis. Enhanced formation of OH radicals probed by ESR techniques in microwave-assisted photocatalysis in aqueous TiO<sub>2</sub> dispersions", *Chemical Physics Letters*, 376, 475–480, 2003.
- [35] Nicolaas A P Franken, Hans M Rodermond, Jan Stap, Jaap Haveman, and Chris van Bree, "Clonogenic assay of cells in vitro", Published online 21 December 2006.

- [36] 이민호, “방사선 분할 조사에서 분할 조사간격과 분할 빔속 변조의 최적화 연구”, 서울대학교 대학원 에너지시스템공학부 석사학위논문, 2012.

Abstract

# **Study on the Cytotoxic Equivalency of Plasma and Radiation by Quantitating OH Radical Production**

Lee, Jin-han

Department of Energy Systems Engineering

The Graduate School

Seoul National University

Research of plasma application in medicine has been studied in various way. However the control of plasma has been set in empirically regardless of universality. And it can be pointed as a weak point for common use of the technic.

For this reason, this paper tried to show the radiation equivalency of plasma by quantitation of OH radical production. Also the clonogenic cell killing effects of plasma and radiation about MECs(mouse endothelial cells) are observed to confirm the radiation equivalency of plasma from above experiments.

In this paper, the plasma was occurred by APPJ(Atmospheric Pressure Plasma Jet) device and the radiation was produced by X-ray beam tube. The analysis of OH radical production was

done by Electron Spin Resonance spectrometer and the target was DMPO solution.

According to the paper, the basic information of DMPO-OH radical such as half-life was confirmed as reliable. Also it is showed that the production of DMPO-OH radical increases when the radiation dose or the plasma production increases. At the experiment for comparison of clonogenic cell killing effect by each device, we used the radiation equivalency of plasma deduced from above experiments. And the results of the experiment were quite different from what we expected. According to former experiments, APPJ plasma can make similar effect of 27 Gy X-ray when the device operated at 15 kHz rf frequency, 2.5 Vp plasma production voltage, and 1 LPM (liter per minute) helium flow rate for two minutes. However, the plasma can only make the effect of 5.5 Gy X-ray. We thought the reason of that is the existence of other factors which can contribute to occur the clonogenic cell killing, not OH radical.

**keywords :** APPJ(Atmospheric Pressure Plasma Jet), X-ray, equivalency, OH radical, Electron Spin Resonance, clonogenic cell killing

***Student Number :*** 2010-23343